

SÉRIE A, N° 1869

N° D'ORDRE : 2736

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE

GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Robert PAULAIS

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES INFINIMENT PETITS CHIMIQUES MINÉRAUX CHEZ LES MOLLUSQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le , *devant la Commission d'Examen.*

11 MAI 1939

MM. G. BERTRAND.. *Président*

M. JAVILLIER.. }
L. PLANTEFOL.. } *Examineurs*

PARIS

LIBRAIRIE E. LE FRANÇOIS
91, BOULEVARD ST-GERMAIN, 91

1939



SÉRIE A, N° 1869
N° D'ORDRE : 2736

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR LE

GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Robert PAULAIS

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES INFINIMENT PETITS CHIMIQUES MINÉRAUX CHEZ LES MOLLUSQUES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

, devant la Commission d'Examen.

MM. G. BERTRAND ...	<i>Président</i>
M. JAVILLIER ..	} <i>Examineurs</i>
L. PLANTEFOL..	

PARIS
LIBRAIRIE E. LE FRANÇOIS
91, BOULEVARD ST-GERMAIN, 91

1939

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.
Doyen C. MAURAIN, Professeur, Physique du Globe.

Professeurs honoraires...	H. LEBESGUE.	DANGEARD.	H. ABRAHAM.
	Émile PICARD.	LESPIEAU.	Charles FABRY.
	Léon BRILLOUIN.	MARCHIS.	Léon BERTRAND.
	GUILLET.	VESSIOT.	P. WINTREBERT.
	PÉCHARD.	PORTIER.	O. DUBOSQ.
	FREUNDLER.	MOLLIARD.	BOHN.
	AUGER.	LAPICQUE.	E. RABAUD.
	BLAISE.	G. BERTRAND.	

PROFESSEURS

M. CAULLERY.....	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	FOCH.....	Mécanique expérimentale des fluides.
Émile BOREL.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	PAUTHENIER.....	Physique (P. C. B.).
Jean PERRIN.....	T	Chimie physique.	De BROGLIE.....	T Théories physiques.
E. CARTAN.....	T	Géométrie supérieure.	CHRÉTIEN.....	Optique appliquée.
A. COTTON.....	T	Recherches physiques.	P. JOB.....	Chimie générale.
J. DRACH.....	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LABROUSTE.....	Physique du Globe.
Charles PÉREZ.....	T	Zoologie.	PRENANT.....	T Anatomie et histologie comparées.
M. GUICHARD.....	T	Analyses et mesures chimiques.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
Paul MONTEL.....	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	COMBES.....	T Physiologie végétale.
L. BLARINGHEM...	T	Botanique.	GARNIER.....	T Mathématiques génér.
G. JULIA.....	T	Mécanique analytique et mécan. céleste.	PÈRES.....	Mécanique théorique des fluides.
C. MAUGUIN.....	T	Minéralogie.	HACKSPILL.....	T Chimie minérale.
A. MICHEL-LÉVY...	T	Pétrographie.	LAUGIER.....	T Physiologie générale.
H. BÉNARD.....	T	Mécanique expérimentale des fluides.	TOUSSAINT.....	Technique Aéronaut.
A. DENJOY.....	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	M. CURIE.....	Physique (P. C. B.).
L. LUTAUD.....	T	Géographie physique et géologie dynamique.	G. RIBAUD.....	T Hautes températures.
Eugène BLOCH.....	T	Physique	CHAZY.....	T Mécanique rationnelle.
G. BRUHAT.....	T	Physique théorique et physique céleste.	GAULT.....	Chimie (P. C. B.).
E. DARMOIS.....	T	Enseignement de Physique.	CROZE.....	Recherches physiques
A. DEBIERNE.....	T	Physique générale et radioactivité.	DUPONT.....	T Théories chimiques.
A. DUFOUR.....	T	Physique (P. C. B.).	LANQUINE.....	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
L. DUNOYER.....	T	Optique appliquée.	VALIRON.....	Mathématiques génér.
A. GUILLERMOND..	T	Botanique.	BARRABÉ.....	Géologie structurale et géologie appliquée.
M. JAVILLIER.....	T	Chimie biologique.	MILLOT.....	Biologie animale (P. C. B.).
ROBERT-LÉVY.....	T	Physiologie comparée.	F. PERRIN.....	Théories physiques.
F. PICARD.....	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	VAVON.....	Chimie organique.
Henri VILLAT.....	T	Mécanique des fluides et applications.	G. DARMOIS.....	Calcul des probabilités et Physique.
Ch. JACOB.....	T	Géologie.	CHATTON.....	T Mathématique.
P. PASCAL.....	T	Chimie générale.	AUBEL.....	Biologie maritime.
M. FRÉCHET.....	T	Calcul différentiel et calcul intégral.	Jacques BOURCART.	Chimie biologique.
E. ESCLANGON.....	T	Astronomie.	M ^{me} JOLIOT-CURIE..	Géographie physique et Géologie dynamique.
M ^{me} RAMART-LUCAS	T	Chimie organique.	PLANTEFOL.....	Physique générale et Radioactivité.
H. BÉGHIN.....	T	Mécanique physique et expérimentale.	CABANNES.....	Biologie végétale (P. C. B.).
			GRASSÉ.....	Enseignement de Physique.
			PRÉVOST.....	Biologie animale (P. C. B.).
			BOULIGAND.....	Chimie (P. C. B.).
				Mathématiques.

Secrétaire A. PACAUD.
Secrétaire honoraire..... D. TOMBECK.

A MON MAÎTRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR GABRIEL BERTRAND

Membre de l'Académie des Sciences, de l'Académie de Médecine
et de l'Académie d'Agriculture

Professeur honoraire de la Faculté des Sciences de Paris
Chef du Service de Chimie biologique à l'Institut Pasteur

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MES PARENTS

INTRODUCTION

Les connaissances sur la constitution élémentaire de la matière vivante ont beaucoup évolué, au cours de ces dernières années. A côté de quelques éléments constitutifs des molécules carbonées plus ou moins complexes, dont l'analyse immédiate avait révélé l'existence dans les tissus vivants, et toujours en quantités importantes, on découvrit, au fur et à mesure que se perfectionnèrent les techniques analytiques, un assez grand nombre de métalloïdes et de métaux, n'existant qu'à l'état de traces très faibles, et dont la détection nécessitait souvent l'emploi de méthodes d'analyse spéciales et ultra-sensibles.

La question se posait de savoir si ces éléments jouent un rôle quelconque dans les processus vitaux, ou si, au contraire, leur présence n'est que purement accidentelle : leur existence dans le sol pouvait en effet suffire à expliquer leur absorption par les plantes et, par l'intermédiaire de ces dernières, leur existence dans les tissus des animaux.

Un certain nombre de recherches avaient déjà conduit à des résultats importants. L'on avait reconnu le rôle primordial que joue, dans les phénomènes de respiration, le fer engagé dans la molécule de l'hémoglobine ; de même l'importance que revêt l'élément zinc dans la croissance de *Aspergillus niger* avait été remarquablement vue par J. Raulin.

La découverte par G. Bertrand du rôle essentiel du manganèse dans les processus d'oxydation du latex de l'arbre à laque (1896) fut à l'origine de toute une série de recherches

qui mirent en évidence l'existence et le rôle d'un certain nombre d'éléments, dont des traces infimes sont ou peuvent être nécessaires pour assurer le développement et l'entretien des êtres vivants ; c'est pour ces éléments que Gabriel BERTRAND a proposé le nom d'*éléments catalytiques, ou oligosynergiques*.

A titre d'exemple, je citerai parmi les nombreuses recherches dues en majorité à Gabriel BERTRAND et à son école : la mise en évidence de l'arsenic normal des tissus (G. BERTRAND) ; la découverte de la présence générale et du rôle du bore (G. BERTRAND et H. AGULHON), la mise en évidence du rôle probable du zinc dans les phénomènes de reproduction (G. BERTRAND et VLADESCO) ; la présence générale du nickel et du cobalt dans les végétaux et les animaux, et le rôle de ces deux métaux comme activants de l'insuline (G. BERTRAND, MOKRAGNATZ et MACHEBŒUF).

Il ne semble plus possible aujourd'hui de dénier à ces oligo-éléments un rôle catalytique d'une importance extrême : de nombreuses séries de recherches entreprises par Gabriel BERTRAND et ses collaborateurs, tant sur les plantes que sur des animaux de laboratoire, nourris à l'aide de régimes synthétiques, ont mis en lumière, de façon irréfutable, l'influence de faibles traces de manganèse, zinc, bore, nickel, cobalt, etc., sur la croissance et la durée de la vie des êtres vivants. Des recherches récentes montrent en outre la synergie d'action du zinc et de la vitamine B₁ (G. BERTRAND et BHATTACHERJEE ; DEY), ainsi que celle du zinc et de la folliculine (G. BERTRAND et WEBER).

Pour certains de ces éléments, les recherches et les résultats obtenus ont dépassé le cadre d'expérimentation du laboratoire. C'est ainsi que de nombreux chercheurs se sont attaqués au problème du rôle du bore dans la vie végétale ; les essais de culture systématique de la betterave, du navet, du rutabaga, ont mis en lumière l'influence de ce métalloïde sur le rendement de la culture ; son absence dans le sol — ou

du moins sa présence en quantités trop faibles — est responsable de la pourriture sèche de ces végétaux. La question revêt aujourd'hui un singulier caractère d'actualité, du fait de l'appauvrissement progressif du sol par les cultures intensives, appauvrissement que l'apport en bore par les seuls engrais de plus en plus purifiés, couramment utilisés, ne saurait actuellement compenser (G. BERTRAND, 1938).

Pour le cobalt, un rôle spécifique et d'extrême importance fut récemment découvert en Nouvelle-Zélande et en Australie. Les troupeaux de moutons de certaines régions présentaient des phénomènes de dénutrition avec anémie prononcée ; la maladie semblait présenter un véritable caractère épidémique et paraissait menacer l'existence même de nombreux troupeaux. La cause en fut trouvée dans le taux très faible de cobalt du sol et des plantes, et il suffit d'ajouter aux eaux de boisson quelques traces de sels de ce métal pour enrayer et faire disparaître rapidement les symptômes de la maladie.

Derniers venus dans la liste des éléments catalytiques, le nickel et le cobalt, dont la mise en évidence systématique dans les végétaux et les animaux ne remonte qu'à une dizaine d'années, n'ont suscité, de la part des chercheurs, qu'un très petit nombre de travaux d'ensemble. La cause en est certainement dans l'extrême dispersion de ces deux métaux dans la matière vivante, d'où découlent de grandes difficultés analytiques, et c'est pourquoi beaucoup de recherches furent exécutées par des méthodes spectrographiques et avec des résultats quelque peu contradictoires.

Aussi le but de ce travail a-t-il consisté, avant tout, en la mise au point d'une technique très sensible et précise permettant le dosage simultané du nickel et du cobalt présents dans les tissus vivants.

En possession de cette technique, et ayant de ce fait la faculté d'utiliser pour le dosage des prises d'essai plus réduites que celles nécessitées par les techniques des auteurs

qui s'étaient précédemment occupés de cette question, j'ai tenté l'étude systématique du nickel et du cobalt chez les mollusques lamellibranches, en rapport avec l'origine et l'âge de ces animaux, ainsi qu'avec les teneurs en autres éléments catalytiques (fer, cuivre, zinc). J'ai ensuite essayé, par analyse immédiate, de déterminer à quelles substances organiques se trouvait fixé le nickel présent dans les tissus vivants.

Je ne veux pas entrer plus avant dans l'exposé de ces recherches sans adresser à M. le Professeur Gabriel BERTRAND, membre de l'Institut, l'expression de mes très vifs remerciements pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire. Qu'il me soit permis de lui exprimer ici ma profonde reconnaissance pour les conseils éclairés dont il me favorisa durant l'exécution de ce travail.

Il m'est également agréable de remercier ici M. CHAUX-THEVENIN, Inspecteur régional du Contrôle sanitaire de l'Office des Pêches, à La Tremblade, qui voulut bien s'occuper de me faire parvenir divers échantillons d'origine exactement déterminée.

Que mes collègues et amis qui m'aidèrent souvent de leurs conseils veuillent bien trouver ici l'expression de mon amicale gratitude.

PREMIÈRE PARTIE

**HISTORIQUE
ET TECHNIQUES ANALYTIQUES**

CHAPITRE PREMIER. — HISTORIQUE

1. — NICKEL ET COBALT CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

A part quelques recherches isolées, dont les résultats furent d'ailleurs contradictoires, le nickel et le cobalt, en tant qu'éléments constitutifs de la matière vivante, n'ont fait l'objet d'études systématiques qu'au cours de ces vingt dernières années.

En 1919, CORNEC (43), étudiant les cendres de végétaux et en particulier de laminaires y décèle, par analyse spectrale, des traces de nombreux éléments, notamment de nickel et de cobalt.

En 1922, G. BERTRAND et MOKRAGNATZ, étudiant la répartition du zinc dans les sols de divers pays d'Europe, découvrent de façon fortuite la présence de nickel et de cobalt (19). Après minéralisation de la terre, le zinc était séparé par la méthode « au zincate de calcium » (13) et, après précipitation du cuivre, était isolé à l'état de sulfure de zinc ; il fut reconnu que ce sulfure de zinc, qui présentait une teinte grisâtre, était souillé de sulfures de nickel et de cobalt qui furent séparés et identifiés respectivement à l'état de combinaison avec la diméthylglyoxime, pour le nickel, et de sel de Fischer, pour le cobalt.

Ces métaux ne pouvant provenir des réactifs qui en étaient rigoureusement exempts, leur présence dans la terre arable était ainsi démontrée.

Peu après, G. BERTRAND et MOKRAGNATZ signalaient la présence du nickel et du cobalt dans les végétaux (19 bis),

et VERNADSKY, d'autre part, annonçait qu'il avait également reconnu la présence de nickel et de cobalt dans diverses plantes (143).

En 1924, G. BERTRAND et MOKRAGNATZ étendirent leurs recherches et montrèrent la présence générale du nickel et du cobalt dans la terre arable (20) (22).

La même année, E. de GOYLER fit une mise au point (71) de diverses publications concernant la présence du nickel et du vanadium dans les pétroles et suggéra quelques hypothèses sur l'importance possible de ces éléments en rapport avec l'origine biologique des hydrocarbures naturels.

La présence du nickel, puis du cobalt (14) (15), dans les tissus d'animaux fut mise en évidence en 1925 par G. BERTRAND et MACHEBŒUF, en utilisant la technique au zincate de calcium ; les deux éléments recherchés, très peu abondants dans les tissus animaux, étaient dosés par des méthodes colorimétriques.

En 1925 également, R. BERG, opérant par l'analyse spectrale, décèle le nickel et le cobalt dans les aliments et les excréments humains (8). McHARGUE (96) signale la présence du nickel et du cobalt à côté du cuivre, du manganèse et du zinc, dans les sols, plantes et animaux et estime, en accord avec les faits et les idées publiés antérieurement par G. BERTRAND, que ces différents métaux jouent sans doute un rôle important comme facteurs essentiels de la vie.

En 1926, G. BERTRAND et MACHEBŒUF mirent en évidence la présence de nickel et de cobalt, en quantité relativement élevée, dans le pancréas des mammifères (17) ; des essais physiologiques effectués sur des lapins et des chiens par ces mêmes auteurs (16) montrèrent que le nickel et le cobalt exerçaient une action stimulante sur l'insuline. Certains cas de diabète purent être traités par ingestion ou injection de sels de nickel et de cobalt (G. BERTRAND et MACHEBŒUF (18), F. RATHERY et M^{lle} L. LÉVINA (125)).

En 1927, McHARGUE, poursuivant ses recherches sur la

présence du manganèse, du cuivre, du zinc, du nickel et du cobalt chez les plantes (98), suggère l'hypothèse que ces métaux jouent un rôle primordial dans les organismes comme catalyseurs ou enzymes.

G. SCHIEKENTHAL publie, la même année, des analyses de terres ; ces terres sont épuisées par l'acide chlorhydrique ; après élimination du fer et de l'aluminium, le nickel est précipité par SH_2 , puis dosé par la diméthylglyoxime ; l'auteur signale qu'il existe une relation entre les quantités de fer et de nickel contenues dans un même sol (131).

En 1930, plusieurs auteurs effectuèrent des recherches sur la présence générale du nickel et du cobalt dans les espèces vivantes ; toutes ces études furent faites par l'analyse spectrale : DUTOIT et ZBINDEN (54) montrèrent que les deux éléments sont surtout localisés dans le pancréas des animaux ; KAUFFMAN et KELLER (84) signalèrent la présence générale du nickel dans les aliments ; FOX et RAMAGE (66) signalèrent la distribution irrégulière des deux éléments dans les tissus animaux ; le cobalt ne fut décelé avec certitude que dans les animaux marins.

En 1931, J. M. NEWELL et E. V. MCCOLLUM mirent en évidence — par analyse spectrale également — la présence constante de traces de nickel dans les organismes marins (115). MARTINI (102) décele le nickel dans de nombreuses plantes par une méthode microchimique qualitative.

MOKRAGNATZ, d'autre part, signale que le nickel possède une action favorable indiscutable sur le développement de l'*Aspergillus niger* ; pour le cobalt, les résultats obtenus ne possédaient pas de caractères suffisamment nets pour permettre de conclure (110).

L'année suivante, S. MÓKRANTZ (111) confirme que le nickel est effectivement absorbé par l'*Aspergillus* cultivé sur le milieu de Raulin. De leur côté, BISHOP et Margaret LAWRENZ (33) décèlent le cobalt dans les cendres de végétaux, par une méthode magnéto-optique.

STARE et ELVEHJEM (136), en 1933, effectuent des dosages de cobalt dans les tissus animaux et les aliments ; ils suggèrent, en accord avec les divers travaux précédents, une action possible du métal dans les phénomènes de nutrition.

G. BERTRAND et NAKAMURA (24) mettent en évidence, sur des animaux de laboratoire, l'importance physiologique des deux métaux ; les animaux nourris avec des régimes synthétiques additionnés de sels de nickel et de cobalt présentent toujours sur les animaux nourris avec le régime témoin, privé des deux métaux, une survie plus ou moins longue.

FISHER et SCOTT reprenant, en 1935, la question de la présence du nickel et du cobalt dans le pancréas, signalent n'avoir en aucun cas constaté la présence de ces métaux dans les pancréas des mammifères (64). Les auteurs détruisent cinq cents grammes environ de pancréas frais par voie humide (destruction sulfonitrique), le résidu de destruction, évaporé à sec, est repris par 10 à 15 centimètres cubes d'acide chlorhydrique, la recherche du nickel et du cobalt est effectuée selon les essais à la touche de FEIGL (10). Dans tous les cas, cette recherche a été négative (*).

L'importance physiologique du cobalt a été récemment confirmée d'une manière quelque peu inattendue et non plus par des expériences de laboratoire, mais dans le cadre même de la nature.

En Nouvelle-Zélande, dans l'île du Sud, on constata que les troupeaux de moutons présentaient des phénomènes de dénutrition caractérisés par une anémie importante ; la maladie semblait présenter de véritables caractères épidémiques. H. O. ASKEW et J. K. DIXON (3) reconnurent que

(*) Il semble bien que cette recherche préalable sur une goutte de liquide soit insuffisamment sensible — malgré l'extrême sensibilité des réactions à la touche de Feigl, — et soit l'unique cause de la divergence des résultats de FISHER et SCOTT et de GABRIEL BERTRAND et MACHEBŒUF.

En effet, les prises d'essai de FISHER et SCOTT devaient contenir environ 50 γ de Ni et un taux plus faible encore de Co (chiffre calculé d'après les résultats publiés par G. BERTRAND et MACHEBŒUF). Par suite, une goutte de solution

des extraits acides des sols de régions où la maladie ne sévissait pas, administrés avec de l'eau de boisson aux agneaux malades, se montraient actifs pour prévenir et guérir la maladie ; ces extraits contenaient plus de cobalt que les extraits des sols des régions à animaux malades ; le chlorure de cobalt, administré seul avec l'eau de boisson à des doses très faibles (8 milligrammes par semaine), se montra aussi efficace que l'extrait de sol. Enfin, des essais de traitement furent tentés en remplaçant le cobalt par des métaux voisins : nickel, fer, cuivre ; ces tentatives ne donnèrent aucun résultat et le phénomène observé paraît justiciable d'une action physiologique spécifique du cobalt.

ASKEW (2) et DIXON (5) étudièrent ensuite la localisation du cobalt dans les organes des animaux malades et comparativement dans les organes correspondants des animaux en bonne santé ; ils aboutirent aux mêmes conclusions, à savoir : que le foie des animaux malades est extrêmement pauvre en cobalt et que le métal, ingéré avec l'eau de boisson, se localise surtout dans cet organe.

Muriel E. BELL (7) confirma ces résultats en montrant

chlorhydrique de cendres renfermait au plus 0,25 de Ni ; ce chiffre est au-dessous de la limite de sensibilité indiquée par FEIGL pour la recherche du nickel en présence d'autres métaux.

D'ailleurs, ayant analysé deux échantillons de pancréas de mammifères, par la méthode qui va être décrite ultérieurement, j'ai obtenu les chiffres suivants :

	Nickel en millièmes de milligramme pour 100 grammes de matière	
	fraîche	sèche
Pancréas de porc	91	285
» » mouton	77,5	310

qui sont du même ordre de grandeur que ceux de G. BERTRAND et MACHEBŒUF.

que des animaux nourris avec des régimes pauvres en cobalt ne tardent pas à présenter des phénomènes d'anémie très prononcés.

Par ailleurs, W. N. NEAL et C. F. ALSMANN (113) mirent en évidence, sur des animaux de laboratoire, des phénomènes de dénutrition avec des régimes pauvres en cobalt ; la courbe de croissance augmente si on ajoute au régime des traces de sels de cobalt.

Tout récemment, enfin, D. A. WEBB (146), étudiant par analyse spectrographique la composition élémentaire des invertébrés marins, y décela du nickel et du cobalt et en signala des quantités importantes dans un mollusque tectibranche du genre *Pleurobranche*.

LES MÉTHODES DE DOSAGE DU NICKEL ET DU COBALT UTILISÉES POUR L'ANALYSE BIOLOGIQUE

Les travaux relatifs à la présence et au rôle possible du nickel et du cobalt chez les êtres vivants sont donc peu nombreux jusqu'ici ; beaucoup font appel, pour déceler les deux éléments à l'analyse spectrale, la grande dispersion de ces métaux rendant très laborieux et délicats l'identification et le dosage par des techniques microanalytiques.

Gabriel BERTRAND et MOKRAGNATZ, les premiers, mirent au point une technique de dosage de ces deux éléments, applicable aux substances biologiques (19) ; cette technique, très rigoureuse, servit par la suite de base à la plupart des autres travaux.

Méthode de Gabriel Bertrand et Mokragnatz

A partir du mélange complexe que constitue le résidu minéralisé de la matière vivante, on sépare le cuivre, le zinc,

le nickel et le cobalt (23) par la technique au zincate de calcium de G. BERTRAND et JAVILLIER (13). On sépare ensuite les quatre métaux par action de l'hydrogène sulfuré dans des conditions définies de pH. Le nickel et le cobalt sont finalement amenés à l'état de pureté. Le nickel est alors dosé par pesée du complexe de nickel diméthylglyoxime et le cobalt, par pesée du sel de Fischer (cobalttrinitrite de potassium).

Cette méthode est très précise, mais exige des prises d'essai de l'ordre du kilogramme de matière fraîche.

Microméthode colorimétrique de G. Bertrand et Machebœuf

Là méthode d'isolement du nickel et du cobalt reste la même, mais, en substituant aux dosages pondéraux des évaluations colorimétriques, on peut réduire les prises d'essai à une centaine de grammes. Le nickel est alors dosé en évaluant l'intensité de la coloration rouge de l'enduit laissé par évaporation de la solution chloroformique du complexe de nickel-diméthylglyoxime, au fond d'une capsule de porcelaine de diamètre connu ; on compare avec des étalons préparés dans des conditions identiques.

Le cobalt donne avec la diméthylglyoxime un complexe brun et soluble dans l'eau ; on compare l'intensité de coloration avec une gamme-étalon.

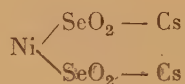
Il est possible, par ces méthodes, de déceler jusqu'à 2 γ de chacun des métaux.

Une méthode analogue a été proposée par OCHOTEN et SYTSCHOFF (117) pour le dosage du nickel dans les aciers : le précipité rouge de nickel diméthylglyoxime est extrait par l'éther, on ajoute alors de l'alcool et du collodion et on obtient une suspension colorée homogène qui peut être examinée au colorimètre.

La réaction microchimique de Martini (1930)

Uniquement qualitative, cette réaction (102) a pour but la mise en évidence du nickel, directement, par examen microscopique de coupes de tissus après traitement par un réactif particulier.

En faisant réagir sur une solution très diluée de sel de nickel, évaporée sur une lame de microscope, du sélénite de potassium, puis du chlorure de césium, on obtient, après un frottement plus ou moins prolongé à l'aide d'un agitateur, des cristaux incolores formés d'octaèdres réguliers, auxquels MARTINI attribue la formule de constitution suivante :



Les caractères morphologiques de ces cristaux ne présentant rien de très caractéristique, MARTINI complète la réaction en ajoutant une goutte de solution alcoolique à 1 % de diméthylglyoxime et en chauffant à début d'ébullition ; on voit alors au microscope les octaèdres se recouvrir d'aiguilles rouges, caractéristiques du nickel-diméthylglyoxime.

L'auteur a appliqué cette technique à l'étude des tissus végétaux et indique une longue liste de plantes ayant donné une réaction positive.

Bien que non susceptible d'applications quantitatives, cette réaction présente un grand intérêt du fait de la quantité extrêmement petite de nickel susceptible d'être décelée.

Mais il y a lieu de se demander, étant donnée précisément la sensibilité de la réaction, si le nickel trouvé ne provient pas d'une impureté quelconque des réactifs (*).

(*) Il est à noter, en effet, ainsi que G. BERTRAND et MOKRAGNATZ (19) le mirent les premiers en évidence, que tous les réactifs de laboratoire, même les plus purs, fournis par l'industrie, renferment des traces de nickel. En conséquence, étant

Et tout d'abord, la réaction est-elle théoriquement possible ? On peut calculer, d'après les résultats d'analyses de Gabriel BERTRAND et MOKRAGNATZ, que la quantité de nickel contenue dans une coupe de tissu végétal sera de quelques millièmes de γ . Cette quantité est-elle décelable au microscope, après action de la diméthylglyoxime ?

L'examen systématique de préparations obtenues en déposant sur une lame de microscope une goutte de solution diluée de chlorure de nickel et une trace de diméthylglyoxime et d'ammoniaque, et en laissant évaporer à l'abri des poussières (ne pas chauffer, car une évaporation trop rapide donne des cristaux de nickel diméthylglyoxime très petits et par suite difficilement identifiables), donne, pour des quantités de nickel de 0,01 et 0,005 des résultats positifs dans tous les cas. Il est même possible, dans la majorité des cas de déceler des cristaux de nickel diméthylglyoxime dans des préparations ne renfermant que 0,002 et 0,001 de nickel.

Ceci ne veut pas dire que la réaction soit pratiquement possible à partir d'une coupe végétale ; il faudrait admettre que le métal contenu dans la substance organique n'est pas dissimulé aux réactifs utilisés. En fait, l'étude de coupes végétales diverses en suivant la technique de MARTINI m'a donné presque toujours des résultats positifs. Ces coupes étaient obtenues à l'aide d'un microtome type Ranvier, dont le plateau avait été recouvert d'un disque de verre (le rasoir, par frottement sur le plateau nickelé, suffirait à entraîner des particules de métal susceptibles de fausser la réaction).

Mais la recherche du nickel dans les coupes devenait négative si, au lieu d'utiliser la technique de MARTINI, on se bornait à faire agir la diméthylglyoxime. Il faut, par conséquent, admettre, ou bien que la technique de MARTINI a la propriété de rendre décelable le nickel lié aux substances

donnée l'extrême sensibilité de la réaction à la diméthylglyoxime, toute recherche qui n'aurait pas été faite avec des produits minutieusement purifiés et vérifiés, ne saurait avoir aucune signification.

organiques, ou bien que les réactifs utilisés contiennent des traces de ce métal. En la circonstance, le chlorure de césium utilisé renfermait de faibles traces de nickel.

Par ailleurs, la recherche directe du nickel sur des extraits aqueux et alcooliques de diverses plantes (et notamment de graines de légumineuses) qui ont été reconnues être très riches en nickel, s'est toujours révélée négative et il semble bien que le métal ne puisse être directement décelé à partir de la substance vivante sans minéralisation préalable.

2. — LE CUIVRE CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

Contrairement au nickel et au cobalt, la présence de ce métal chez les êtres vivants a fait l'objet d'observations très anciennes.

Entrevu par JOHN (80) dans les cendres végétales, en 1814, il fut étudié pour la première fois par MEISSNER (106) en 1816. En France, SARZEAU (130), (1830-1833), dosa le cuivre dans les plantes. Parmi les travaux plus récents, on peut citer ceux de GUÉRITHAULT (1910) (73) et ceux de MAQUENNE et DEMOUSSY (101) (101 *bis*), qui mirent au point des méthodes sensibles de recherche du métal et étudièrent sa localisation dans de nombreuses plantes, en 1920. Le fait que le cuivre n'est pas indifférent à la vie de la plante fut révélé par divers travaux, notamment celui de JAVILLIER sur l'*Aspergillus niger* (79 *ter*), confirmé et étendu depuis lors.

En 1883, BIZIO (34) signala la teneur élevée en cuivre des escargots et des moules ; il montra que le métal était surtout localisé dans les organes respiratoires. On devait reconnaître par la suite que le cuivre est combiné à des protides formant un pigment respiratoire (hémocyanine), analogue à l'hémoglobine.

La présence du cuivre chez les huîtres a suscité un certain nombre de recherches. CUZENT, en 1863 (47), analyse les

huîtres de Falmouth et y trouve une forte proportion de cuivre (216 milligrammes par kilogramme). FERRAND (63) trouve 9 milligrammes de cuivre dans une huître pesant 4 gr. 5.

En opérant par électrolyse, BALLAND (5) trouve 5 milligrammes de cuivre dans 2 huîtres, et JAILLARD (78) 62 milligrammes, dans une douzaine d'huîtres algériennes.

LEHMANN (92) trouve 60 milligrammes de cuivre dans un kilog. d'huîtres, mais un deuxième échantillon lui donne un chiffre de 16 milligrammes seulement. LOWE, en 1897, trouve dans des huîtres de Swansea jusqu'à 40 milligrammes par individu (93). En 1895, DUBOIS (53) fait une étude complète de la teneur en cuivre des animaux inférieurs et trouve une grande quantité de cuivre dans les huîtres (9 mg. 6 et 13 mg. 79 pour 100 grammes d'animal frais).

WILLARD (148), en 1908, analyse des huîtres de la côte est des États-Unis ; il trouve des chiffres très variables de cuivre allant de 50 à 1.700 milligrammes pour 1.000 grammes de matière fraîche.

HILTNER et WICHMANN (76), en 1919, analysent de nombreuses huîtres de différentes côtes des États-Unis, au point de vue de la teneur en cuivre et en zinc ; ils constatent que le cuivre varie de 20 à 539 milligrammes par kilogramme de matière fraîche et égouttée ; ils semblent rapporter à une teneur élevée en cuivre les colorations bleuâtres ou verdâtres présentées par certaines huîtres.

L'année suivante, ROSE et BODANSKY dosent le cuivre par la colorimétrie à l'aide de l'eau céleste, après isolement à l'état de sulfure de cuivre, dans de nombreux organismes marins ; ils trouvent pour les huîtres de 26 à 60 milligrammes de cuivre par kilogramme, répartis de façon à peu près équivalente dans les différents organes (muscle excepté) (128).

WHITE (147), en 1921, signale une teneur en cuivre anologue dans les huîtres : 43 mg. 8 dans les tissus, par kilogramme. SEVERY, en 1933, analysant les huîtres de Cali-

fornie (132), y trouve une teneur très inférieure en cuivre et également en zinc, par rapport aux huîtres de la côte Est (4 à 12 milligrammes de cuivre par kilogramme, contre 30 à 44 milligrammes pour les huîtres de la côte Est).

HERDMANN et BOYCE (75), J. NELSON (114), et beaucoup d'autres auteurs, ont signalé la richesse en cuivre des huîtres.

En 1928, WANG-TAI-SI (145) publia une étude complète du fer, du manganèse et du cuivre chez les mollusques, ce dernier métal étant dosé par colorimétrie à l'aide de l'ammoniaque.

La présence générale du cuivre chez les êtres vivants est donc parfaitement démontrée. Quant au rôle physiologique qu'il peut y jouer, des recherches aujourd'hui classiques, ont montré qu'il entrait dans la constitution d'un pigment respiratoire, l'hémocyanine, présent dans de nombreuses espèces de mollusques (*).

De plus, Herbert PRYTHCHERCH (124), étudiant, en 1931, les influences de diverses conditions de pH, de salinité, d'oxygène dissous, etc., sur la fixation des larves d'huîtres, reconnut que ces larves nageantes ne peuvent se fixer sur les roches et sécréter leur coquille que si l'eau de mer renferme un taux de cuivre supérieur à la teneur normale ; ceci explique la fixation facile et la formation de gisements naturels importants à l'embouchure des fleuves, l'eau douce apportant le supplément de cuivre nécessaire.

Pour les mammifères, il a été montré récemment (ELVEHJEM et divers auteurs américains) (56, 57, 58, 142, 85, 46) que le cuivre joue un rôle important dans la formation de l'hémoglobine. En l'absence de ce métal, le fer est bien assimilé et mis en réserve dans le foie de l'animal, mais cette réserve ne peut être utilisée pour la formation d'hémoglobine qu'en présence d'une certaine quantité de cuivre ;

(*) Parmi les auteurs dont le nom reste attaché à ces recherches, il convient de citer : HARLESS (1847), FRÉDÉRICQ (1878), HENZÉ (1901), DHÉRE (1900-1919).

cette action du cuivre paraît être rigoureusement spécifique (112). De fait, au cours de ces dernières années, de nombreux travaux mirent en lumière le rôle du cuivre dans le traitement de l'anémie (41, 133). En tablant sur la haute teneur en cuivre des huîtres et sur le fait que ce métal est chez ces animaux à un état organique et assimilable, PEASE, COULSON et, en France, LÉON BINET et M. V. STRUMA, constatèrent que les huîtres possédaient une réelle valeur pour le traitement de l'anémie (44, 45, 32).

PRINCIPALES MÉTHODES DE DOSAGE DU CUIVRE UTILISÉES DANS L'ANALYSE BIOLOGIQUE

Les méthodes utilisées sont très nombreuses et peuvent être classées en trois catégories principales.

a) Méthodes pondérales

Raphaël DUBOIS (53), puis GUÉRITHAUT (73) ont utilisé l'isolement du cuivre par électrolyse, suivi d'un dosage par pesée de l'électrode ; la méthode est très précise, mais exige des prises d'essai assez grandes, car la teneur en cuivre des êtres vivants est faible (*). Aussi l'emploi de méthodes pondérales pour le dosage du cuivre chez les êtres vivants ne s'est-il pas généralisé (**).

b) Méthodes volumétriques

On peut citer la technique mise au point par GUILLET (74) : le cuivre est isolé par microélectrolyse, puis dosé

(*) Lorsque les quantités de cuivre étaient trop faibles pour permettre un dosage pondéral, GUÉRITHAUT, avait recours à une évaluation colorimétrique par l'intermédiaire de l'eau céleste.

(**) Une méthode pondérale, basée sur l'emploi de la benzoïnoxime a cependant été récemment décrite par Z. GRUZEWSKA et G. ROUSSEL (72).

au permanganate, selon la méthode molybdomanganométrique de FONTÈS et THIVOLLE. On dose ainsi quelques centièmes de milligrammes de cuivre ; le procédé est précis, mais demande certaines précautions, notamment lors du titrage (opérer sous CO_2).

c) Méthodes colorimétriques

Ce sont celles qui sont généralement utilisées en raison de leur simplicité et de leur sensibilité.

La formation d'eau céleste sous l'action de l'ammoniaque a été utilisée par divers auteurs et notamment par WANG-TAI-SI (145), HILTNER et WICHMANN (76), etc. La réaction est pratiquement spécifique, d'autant qu'elle est le plus souvent associée à un isolement du métal à l'état de SCu , en milieu chlorhydrique.

MAQUENNE et DEMOUSSY (101) ont eu recours à la formation d'un ferrocyanure double de cuivre et zinc, doué d'une coloration bleue intense ; la méthode est très sensible, mais très délicate à réaliser, car il doit exister un certain rapport entre la proportion de zinc et celle de cuivre.

La réaction de SPACu , formation d'un sulfocyanure complexe de cuivre et de pyridine, soluble dans le chloroforme et doué d'une intense coloration verte, a été adoptée par de nombreux auteurs à la suite de BRAZZO (31).

GOLSE (69), enfin, a eu recours, pour déceler de très petites quantités de cuivre, à la formation du précipité de sulfocyanure double de cuivre et de mercure ; il opère en présence d'un excès de zinc et obtient un précipité mixte coloré en violet qui est centrifugé dans un tube calibré ; le culot est comparé à une gamme : la méthode est très sensible, mais manque de précision, l'évaluation de l'intensité de coloration des précipités étant assez délicate.

Bien d'autres techniques ont été proposées et, entre

autres, celles de EISLER, ROSDAHL et THEORELL (55), qui mesurent à l'électrophotomètre la coloration jaunâtre donnée par les sels de cuivre en présence de dithiodiéthylcarbamate acide de sodium.

Parmi les réactions les plus sensibles de l'ion cuivre, il convient aussi de citer celle récemment décrite par Gabriel BERTRAND et L. de SAINT-RAT (*Comptes rendus*, 203, p. 140, 1936). L'urobiline donne avec les sels de cuivre une teinte rose très sensible permettant d'apprécier 1 γ de métal.

3. — LE ZINC CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

La découverte de la présence de zinc dans les êtres vivants remonte à 1854, époque à laquelle BRAUN et BELLINGRODT (40) caractérisèrent le métal dans diverses plantes calaminaires ; en 1877, LECHARTIER et BELLAMY (91) étendirent ces résultats montrant la présence du zinc dans diverses espèces animales et végétales.

En 1908, JAVILLIER (79), utilisant une technique très sensible de dosage, mise au point avec G. BERTRAND (13) reprend et précise cette étude ; il démontre la présence générale du zinc dans toutes les espèces végétales étudiées ; un peu plus tard, MOKRAGNATZ (110 *bis*) met en évidence la présence générale de zinc dans la terre arable et G. BERTRAND et BENZON (11) étudient la répartition du métal dans un grand nombre d'aliments végétaux.

Pour les animaux, entre autres travaux, DELEZENNE (48), en France, signale en 1919, que le zinc doit être considéré comme un constituant normal de la cellule animale ; GIAJA (70), BODANSKY (36) montrent sa présence dans divers organes, et, enfin, G. BERTRAND et VLADESCO (26, 27), dans une étude d'ensemble, en indiquent la répartition dans l'échelle animale.

La présence du zinc chez les mollusques a suscité de nombreuses recherches. BRADLEY, en 1904 (38), décèle le zinc, à côté du cuivre, dans le foie de *Sycotypus canaliculatus* et dans *Fulgas carica* ; par contre, il ne trouve pas de zinc dans *Ostrea Virginaria*.

En 1905, MENDEL et BRADLEY (107) trouvent que dans le *Sycotypus*, seuls le foie et le sang renferment du zinc (0 mgr. 7 de zinc pour 100 gr. de foie sec) ; ils ne peuvent déceler le métal dans d'autres espèces de mollusques, en particulier dans les moules et les huîtres. SALE, en 1915 (129), signale la présence du zinc dans les huîtres de Chesapeake Bay, et deux ans plus tard, PHILLIPS (122), étudiant plusieurs espèces provenant de régions non contaminées par des apports industriels, conclut à la présence normale de zinc dans les animaux marins.

HILTNER et WICHMANN (1919) constatent (76) la présence du zinc dans toutes les huîtres américaines de la côte de l'Atlantique et signalent qu'on peut en rencontrer des taux très élevés ; ils ne peuvent établir de rapport ni entre la teneur en zinc et la taille de l'huître, ni entre les teneurs de cuivre et de zinc, ni, enfin, entre le taux de ces métaux dans les huîtres et dans l'eau de mer au sein de laquelle elles vivent.

DELEZENNE, en France, trouve (48) également chez les mollusques une teneur en zinc beaucoup plus élevée que chez les vertébrés. BODANSKY (35) signale la présence constante de zinc dans les espèces marines ; étudiant séparément les divers organes, il trouve que le muscle en renferme très peu ; le métal est réparti de façon à peu près identique, dans les autres organes. SÉVERY (132) confirme ces résultats ; les huîtres de Californie, très riches en zinc, peuvent renfermer jusqu'à 99 milligrammes de métal pour 100 grammes de matière fraîche.

G. BERTRAND et VLADESCO (28) trouvent le zinc, de façon constante, dans de très nombreuses espèces de mollusques ; les proportions sont très variables d'espèce à espèce et même,

pour une seule espèce, d'individu à individu ; les huîtres, et particulièrement *Gryphea angulata*, se montrent les plus riches en zinc. Les organes génitaux semblent présenter une teneur élevée.

WANG-TAI-SI (1928) confirme (145) ces résultats ; il trouve aussi le zinc dans toutes les espèces analysées et constate que les lamellibranches se montrent les plus riches.

Enfin, Y. BRANDT-BEAUZEMONT (39) dose le zinc dans de nombreux échantillons de Gryphée provenant de la même région (parcs de La Tremblade), y trouve des chiffres très variables, mais ne peut mettre en évidence ni variation saisonnière du métal, ni rapport entre le zinc et le glycogène contenus dans les divers lots analysés.

L'activité physiologique du métal a suscité de nombreux travaux. Elle a été établie par RAULIN pour l'*Aspergillus niger*. Cette importante notion, un instant annihilée par des expériences contradictoires, a été reprise et amplifiée par JAVILLIER (79) qui démontra que le zinc est nécessaire pour la croissance de l'*Aspergillus* ; cultivé sur milieu synthétique, en l'absence de zinc, l'*Aspergillus* n'atteint qu'un faible développement ; si on ajoute à la solution nutritive une trace de sel de zinc, la croissance redevient normale ; les concentrations favorables vont de 1×10^{-7} à 1×10^{-4} , des concentrations supérieures donnent lieu à des effets toxiques. Le même auteur a pu montrer que le zinc également nécessaire au développement d'autres végétaux achlorophylliens et des plantes supérieures telles que le blé. MAZÉ (105), dans ses recherches sur les solutions physiologiquement équilibrées put, avec le maïs, confirmer ces données.

Chez les animaux, DELEZENNE (48) indique un rapport entre l'activité des venins de serpents et leur teneur en zinc ; aussi suggère-t-il que ce métal doit jouer un rôle dans des processus catalytiques intracellulaires. Gabriel BERTRAND et VLADESCO (29) signalent des variations dans la teneur du zinc en fonction de l'âge des animaux ; la teneur est maximum

pendant le tout jeune âge ; elle décroît durant la période de la lactation (le lait est très pauvre en zinc), puis augmente rapidement à partir du sevrage. Ils trouvent, chez le cheval, une grande quantité de zinc dans les testicules et les glandes mammaires ; chez le hareng, la teneur en zinc des organes génitaux varie suivant la périodicité de leur fonctionnement physiologique. Les auteurs concluent que le zinc doit jouer un rôle dans les fonctions de reproduction.

G. BERTRAND et BENZON (11), alimentant des souris avec un régime synthétique totalement privé de zinc, constatent un arrêt rapide de la croissance et l'apparition d'accidents entraînant la mort en quelques jours ; l'addition au régime de petites quantités de zinc suffit à assurer la croissance des animaux et prolonge notablement la durée moyenne de leur vie. Le zinc est donc un élément indispensable pour la croissance des souris.

Cette question fut reprise quelques années plus tard par G. BERTRAND et BHATTACHERJEE (12). Il fut alors possible d'adjoindre au régime des vitamines purifiées ou synthétiques. Les résultats confirmèrent ceux de G. BERTRAND et BENZON ; soumises au régime renfermant toutes les vitamines connues, nécessaires à la vie des animaux, les souris ne purent se développer normalement en l'absence de zinc. Après un arrêt rapide de la croissance et une chute régulière de poids, elles mouraient en quinze à vingt jours ; au contraire, si une trace de zinc était ajoutée au régime, la vie des animaux pouvait être entretenue normalement pendant plusieurs mois. McHARGUE (97), HUBBEL et MENDEL (77) sont arrivés à des résultats analogues, sur des rats et sur des souris.

Malgré ces travaux, McCOLLUM (95) a signalé, en 1933, que les souris étaient susceptibles de se développer normalement avec un régime entièrement privé de zinc, mais STIRN, ELVEHJEM et HART (137) ont montré que la caséine utilisée par cet auteur renfermait des traces de zinc en quantité suffisante pour fausser totalement ces expériences.

Enfin, tout récemment, DEY (50) montra que le zinc était également nécessaire pour assurer la croissance du pigeon ; *in vitro*, l'action catalytique de la vitamine B₁ sur la respiration des tissus avitaminés n'est possible que si le milieu contient du zinc.

Quant au rôle qu'il peut jouer chez les mollusques, MENDEL et BRADLEY (107) pensent que le zinc du foie du *Sycotypus* est engagé dans une combinaison protidique respiratoire, pour laquelle ils proposent le nom d' « Hémosycotypine ». HILTNER et WICHMANN (76) proposent de substituer à ce nom celui, plus général, d' « Hémozincine ».

G. BERTRAND et VLADESCO pensent que le zinc joue un rôle dans les fonctions de reproduction (30), les glandes génitales renfermant généralement plus de zinc que les autres organes.

WANG-TAI-SI (145) étudiant les différents protéides du sang des moules trouve 29,6 % de zinc dialysable et conclut à la pluralité des combinaisons métallo-protidiques.

Enfin, Y. BRANDT-BEAUZEMONT (39) met en évidence, par une série de fractionnements, le caractère protidique des combinaisons organo-métalliques du zinc, chez *Gryphea angulata*.

TECHNIQUE DE DOSAGE DU ZINC

Pour les études biochimiques, on a eu recours à deux techniques principales.

La première consiste en un dosage volumétrique au ferrocyanure de potassium et a surtout été utilisé par les auteurs américains ; elle présente des avantages du point de vue de la rapidité, mais il peut y avoir quelque danger à appliquer à un milieu aussi complexe que des cendres une telle méthode de dosage sans procéder à un isolement préalable du métal.

La seconde, qui est la méthode pondérale de Gabriel BERTRAND et JAVILLIER, consiste en la séparation du zinc à l'état de zincate de calcium, puis précipitation à l'état de pureté par l'hydrogène sulfuré, à pH convenable. Elle présente toutes les garanties nécessaires de précision et de certitude et devra être utilisée de préférence à toute autre.

CHAPITRE II

ÉTABLISSEMENT DES TECHNIQUES DE DOSAGE DU NICKEL, DU CUIVRE, DU COBALT ET DU FER

1. — DOSAGE DU NICKEL

Pour diminuer le plus possible les prises d'essai nécessaires au dosage, il y a lieu d'utiliser une méthode aussi sensible que possible, permettant d'évaluer, avec une bonne approximation, des quantités de nickel de l'ordre du millième de milligramme. Seule une technique colorimétrique est utilisable dans ce cas, et le problème revient donc à chercher une réaction colorée du nickel présentant une sensibilité suffisante et une spécificité aussi grande que possible. Trois réactions ont été signalées et utilisées en vue de dosages colorimétriques :

1. — Évaluation directe de la coloration du précipité de nickel diméthylglyoxime

Cette méthode a été utilisée par MM. G. BERTRAND et MACHÉBŒUF (14), elle est spécifique du nickel, mais ne permet pas de descendre au-dessous de 2% et sa précision n'est bonne que vers 5-10%.

Les dosages colorimétriques effectués en maintenant le précipité de nickel-diméthylglyoxime en suspension grâce au collodion (82) ne présentent pas d'avantages sur la méthode précédente.

La technique microchimique de MARTINI (102) qui peut facilement être utilisée pour l'examen des cendres des tissus vivants est extrêmement sensible, mais ne peut fournir qu'une approximation très grossière de la teneur en nickel.

2. — Réaction à la formaldoxime, de Denigès (49)

C'est une extension de la réaction classique que BACH avait proposée pour la recherche du cuivre.

DENIGÈS utilise un réactif préparé par action du triméthylène sur le chlorhydrate d'hydroxylamine, à température d'ébullition et en présence d'eau.

A la solution très diluée de sel de nickel, il ajoute une goutte de ce réactif et une goutte de soude dix fois normale. Il se développe une teinte brune, plus ou moins intense selon la quantité de nickel, et encore perceptible pour une solution renfermant 1% de nickel dans 10 cc. ; cette coloration a été utilisée par l'auteur pour le dosage du nickel en présence de cobalt.

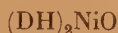
Les sels de cuivre, de manganèse et de fer donnent également des combinaisons colorées avec le réactif, dont la spécificité est, par suite, très restreinte.

En outre, il semble que cette réaction puisse mal se prêter à un dosage colorimétrique précis, tout d'abord parce que l'intensité de la coloration varie assez rapidement en fonction du temps, et en second lieu parce que cette intensité, et la coloration elle-même, sont sous la dépendance des quantités relatives de formaldoxime et de soude, ajoutées à la solution, et des sels que peut contenir cette dernière.

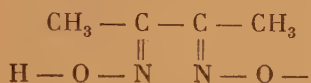
3. — Réaction du nickel tétravalent et de la diméthylglyoxime selon Feigl (59)

La réaction classique consiste à oxyder, à l'ébullition et en milieu sodique, le précipité de nickel-diméthylglyoxime,

au moyen de l'oxyde puce de plomb ; le précipité de nickel-diméthylglyoxime se dissout et on obtient un dérivé rouge, qui peut être précipité de sa solution par un acide minéral et auquel FEIGL assigne la formule suivante :



DH représentant le radical



L'étude de cette réaction a été reprise par ROLLET (127) qui a modifié la technique en réalisant l'oxydation à froid, par les hypochlorites, ou mieux, les hypobromites alcalins ; ce mode opératoire a l'avantage de supprimer l'action de la chaleur sur le complexe obtenu, qu'une ébullition trop prolongée peut détruire.

D'après ROLLET, la teinte obtenue par les hypobromites tire davantage sur l'orangé que celle de la réaction classique ; elle vire très lentement pour se rapprocher de cette dernière, mais ce virage n'est pas sensible pendant les premières heures.

ROLLET a utilisé cette méthode pour doser colorimétriquement le nickel dans les aciers, et il donne un exemple d'application aux tissus animaux, sans toutefois indiquer la technique d'isolement du métal.

Un procédé analogue a été utilisé par JONES (82) pour le dosage des aciers au nickel.

La réaction s'exécute de la manière suivante : à la solution aqueuse et très diluée de sel de nickel, on ajoute quelques gouttes d'eau de brome (*) puis de l'ammoniaque à 10 %, goutte à goutte, jusqu'à décoloration et finalement une trace de solution alcoolique à 1 % de diméthylglyoxime. La teinte rouge orangée se développe presque instantanément, puis évolue dans le temps d'une manière très lente. Les quan-

(*) Solution aqueuse de brome saturée à la température du laboratoire.

tités de réactif ajoutées paraissent sans grande influence sur l'intensité de la coloration finale.

Il semble donc que cette réaction soit susceptible de se prêter à un dosage colorimétrique précis, mais il convient de faire tout d'abord une étude détaillée des différents facteurs susceptibles d'intervenir.

Auparavant il faut signaler que d'autres oxydants peuvent être utilisés ; les hypoiodites réagissent d'une manière identique aux hypochlorites et aux hypobromites alcalins ; de même les persulfates en présence de nitrate d'argent, mais la décoloration dans le temps est plus rapide. L'eau oxygénée, les iodates, etc., sont sans action.

Aucun des oxydants essayés ne présente d'avantages sur les hypobromites, qui seront seuls utilisés pour l'étude systématique de cette réaction.

EMPLOI DE L'ÉLECTROPHOTOMÈTRE A CELLULES PHOTOÉLECTRIQUES DE P. MEUNIER

Quelle que soit la méthode utilisée pour le dosage colorimétrique (colorimètre type Dubosc, gammes-étalon, etc.), les résultats sont toujours entachés d'une certaine erreur ; cette erreur, qui peut être évaluée à 5 ou 10 % dans les cas les plus favorables, devient beaucoup plus considérable, lorsqu'il s'agit d'apprécier des intensités de coloration très faibles.

On a intérêt à substituer à l'œil la cellule photoélectrique, qui permet des dosages plus précis, mais à la condition de se mettre à l'abri de nouvelles causes d'erreurs inhérentes aux appareils utilisés (variations de l'intensité du flux lumineux excitant les cellules, variations de la surface d'éclairement, etc.).

L'appareil décrit par P. MEUNIER (109), grâce au montage

en opposition de deux cellules photoélectriques met à l'abri de ces causes d'erreur. Il présente, de plus, l'avantage appréciable de n'exiger qu'un seul étalonnage qui sera réalisé une fois pour toutes avec une solution exactement titrée.

Enfin, on pourra constamment contrôler l'identité du produit dosé en mesurant la valeur de l'absorption dans des longueurs d'ondes convenablement choisies ; l'angle formé par les courbes qui figurent l'absorption en fonction de la concentration pour deux longueurs d'ondes déterminées est, en effet, caractéristique de la coloration du composé dosé ; ce contrôle permanent donne aux dosages ainsi exécutés un caractère de certitude qui fait souvent défaut dans les autres techniques colorimétriques.

ÉTUDE DE LA RÉACTION

La réaction a toujours été faite en utilisant comme oxydant l'hypobromite d'ammonium et suivant la technique indiquée plus haut.

1. — VARIATION DE L'INTENSITÉ DE LA COLORATION EN FONCTION DU TEMPS

La coloration se développe dès l'addition de diméthylglyoxime et le maximum est atteint en quelques minutes. Les mesures ont porté sur un laps de temps de deux heures, ce qui est largement suffisant, le dosage colorimétrique ne demandant que quelques minutes.

Le graphique ci-dessous résume les résultats de plusieurs séries de mesures ayant été exécutées sur des solutions de concentration variable en nickel ; en aucun cas, il n'a été constaté de variation au cours des deux premières heures.

Après plusieurs heures, une légère modification se mani-

feste : la teinte vire au rouge, ainsi que l'a signalé ROLLET (127), puis se décolore d'une façon très lente.

Il résulte de ces faits qu'on pourra en toute sécurité ef-

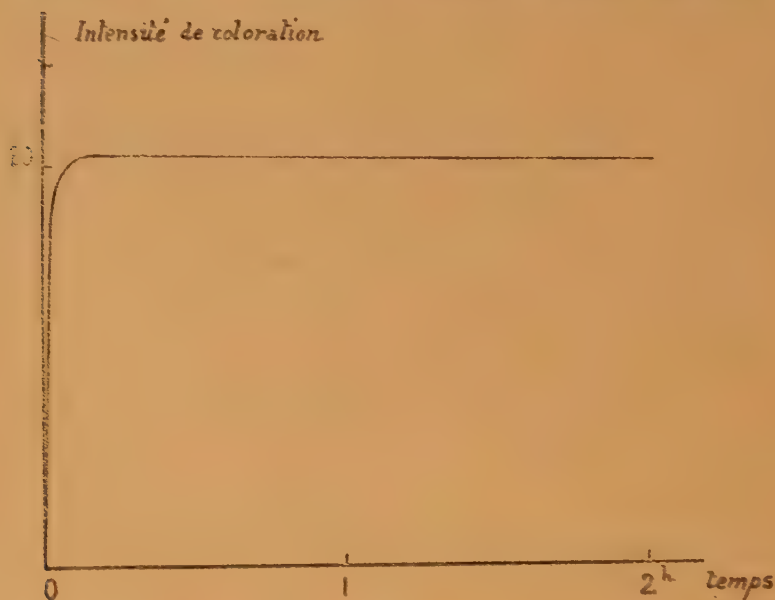


Fig. 1

fectuer les dosages entre 15 minutes et 1 heure après obtention de la réaction colorée.

2. — SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTION

La réaction n'est pas spécifique du nickel, et les métaux donnant avec la diméthylglyoxime des combinaisons colorées solubles gêneront le dosage ; c'est le cas principalement pour le fer, le manganèse, le cuivre et le cobalt.

Il est donc nécessaire de combiner cette réaction avec une technique appropriée d'isolement du nickel ; la méthode au zincate de calcium permet la séparation du fer et du manganèse.

nèse par l'ammoniaque ; le cuivre est éliminé par l'hydrogène sulfuré en milieu chlorhydrique. Quant au cobalt, il passe à l'état trivalent sous l'influence de l'hypobromite d'ammonium et donne, si sa concentration est suffisante, un précipité noir d'oxyde, mais, à une faible concentration, inférieure à 10%, on n'obtient, avec ce métal, ni coloration, ni précipité.

3. — INFLUENCE DES PROPORTIONS RELATIVES DE RÉACTIFS, SUR L'INTENSITÉ DE LA COLORATION

Ces essais ont été faits sur une solution renfermant 60% de nickel pour 100 cc.

Le réactif oxydant doit toujours être en excès, sinon on a une réaction incomplète, avec formation concomitante de précipité rouge de nickel-diméthylglyoxime et de dérivé d'oxydation soluble : en prenant comme quantité de base de réactif oxydant 0 cc. 5 de solution saturée d'eau de brome, on est assuré d'oxyder totalement les 60% de nickel présents dans la solution.

a) Influence de l'excès d'ammoniaque

A la solution contenant 60% de nickel, ont été ajoutés 0 cc. 5 d'eau de brome, puis des taux croissants d'ammoniaque et, finalement, 0 cc. 5 de solution alcoolique à 1 % de diméthylglyoxime. Les lectures ont été faites après 15, 30 et 60 minutes.

Compte tenu des erreurs expérimentales, on voit que l'addition d'un excès d'ammoniaque n'exerce aucune influence sur l'intensité de la coloration.

Quantité d'ammoniaque ajoutée	Absorption					
	Dans le bleu			Dans le vert		
	Après 15'	Après 30'	Après 60'	Après 15'	Après 30'	Après 60'
0 cc. 5 d'ammoniaque à 10 %	82	82	82	66	66,5	66
0 cc. 75 » »	82	82,5	82	65,5	66	66
1 cc. » »	83	82,5	82,5	66	66	66,5
2 cc. » »	82	82	82,5	66	66	66
5 cc. » »	82,5	82	82	65,5	65,5	65,5
10 cc. » »	82	82	82	66	66	66
2 cc. d'ammoniaque pure	82	82	82	66	66,5	66
5 cc. » »	82,5	82,5	82	66,5	66	66,5

b) Influence de l'excès d'hypobromite

Cette étude a été réalisée en ajoutant à la solution des quantités variables d'eau de brome, cette addition étant aussitôt suivie de celle d'une quantité d'ammoniaque à 10 % suffisante pour décolorer totalement le liquide.

Il résulte des mesures effectuées avec des quantités d'eau de brome variant de 0 cc. 5 à 20 cc. (pour 100 cc. de volume final) que ces additions n'exercent aucune influence sur le dosage. Tout au plus peut-on constater une décoloration plus rapide dans le temps lorsque l'hypobromite est en grand excès, mais cette décoloration n'intéresse pas les limites dans lesquelles on se place pour le dosage (de 15 à 60 minutes).

c) Influence de l'excès de diméthylglyoxime

Les essais ont été effectués avec des quantités de solution alcoolique de diméthylglyoxime croissantes, de 0 cc. 5 à

10 cc. ; comme pour les autres réactifs étudiés, les variations d'intensité constatées, ne dépassent pas l'erreur systématique des mesures.

4. — INFLUENCE DE L'ANION DU SEL DE NICKEL

Le sel utilisé pour les essais précédents était du chlorure de nickel, pur et anhydre, obtenu par la méthode de SOERENSEN (*) ; ce sel a été transformé en sulfate et en nitrate (par action des acides correspondants, distillés et purs, sur le carbonate). Les sels obtenus, purifiés par recristallisation, ont servi à préparer des solutions titrées par dosage pondéral à la diméthylglyoxime.

Il résulte de toutes les mesures effectuées que les intensités de colorations, pour des quantités égales de nickel, sont rigoureusement les mêmes quel que soit l'anion auquel est combiné le nickel.

5. — INFLUENCE DE QUELQUES SELS SUSCEPTIBLES D'ÊTRE PRÉSENTS DANS LA SOLUTION

L'étude a porté plus particulièrement sur les sels pouvant accompagner le nickel lors de son isolement par la technique au zincate de calcium telle qu'elle sera décrite plus loin.

Les sels étudiés étaient tout d'abord vérifiés, du point de vue de leur teneur en nickel ; le chlorure et le sulfate de calcium, ainsi que le sulfate d'ammonium ont été essayés.

Le sulfate de calcium à saturation dans la liqueur ; le

(*) On trouvera dans la thèse de MOKRAGNATZ (110 bis) les détails opératoires.

(**) Ces précautions ont eu pour but d'éviter les erreurs accidentelles dues aux impuretés que présentent toujours les sels courants du commerce.

chlorure de calcium et le sulfate d'ammonium à la dose de 10 grammes pour 100 cc. de la liqueur, n'apportent aucune perturbation au dosage.

6. — ÉTABLISSEMENT DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

La courbe a été réalisée avec une solution exactement titrée de chlorure de nickel pur ; toutes précautions ont été prises pour réduire au minimum l'erreur pouvant provenir de la mesure de la prise d'essai.

Pour les faibles concentrations, seules dosables avec l'électrophotomètre utilisé, l'absorption est proportionnelle à la concentration en nickel (loi de BEER). En conséquence, si l'on porte en abscisses les divisions de l'appareil et en ordonnées les teneurs en nickel, les mesures effectuées en lumière bleue et en lumière verte pour diverses concentrations en nickel donnent deux droites, faisant entre elles un angle déterminé et caractéristique de la teinte rose orangée mesurée.

7. — SENSIBILITÉ ET PRÉCISION DU DOSAGE

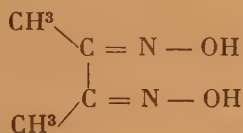
Une quantité de nickel de 10γ , dans 100 cc. de liquide donne à l'électrophotomètre une déviation mesurable ; on pourra doser de 10 à 100γ dans 100 cc. de liquide. L'appareil mesurant l'absorption du faisceau lumineux traversant une lame de liquide coloré de 1 cm. d'épaisseur, et 10 centimètres cubes de liquide suffisant largement pour un dosage, on pourra avec la même précision doser de 1 à 10γ dans 10 cc. de liquide.

En d'autres termes, la méthode permet de doser le nickel dans des solutions dont la concentration varie de 10^{-7} à 10^{-6} et l'on s'arrangera toujours pour amener le liquide dans cet intervalle de concentration par une dilution convenable.

Pour cette concentration de 10^{-6} , l'opacité de la solution est mesurée par 110 divisions de l'appareil ; l'erreur systématique commise lors de la mesure est d'une demie-division de l'appareil. En conséquence, lorsqu'on dosera dans 10 centimètres cubes de liquide de 0 à 10% de nickel, les dosages seront entachés d'une erreur systématique de 0,05 environ ; on voit qu'il est possible de réaliser des dosages avec une erreur relative inférieure à 1 %.

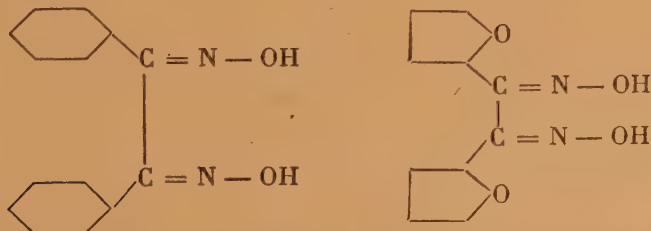
QUELQUES ESSAIS SUR DES RÉACTIONS PLUS SENSIBLES

Différents auteurs ont cherché à augmenter la sensibilité de la précipitation du nickel par les α -dioximes ; pour cela, ils ont substitué aux deux radicaux méthyle de l' α -diméthylglyoxime, utilisée par TSCHUGAEFF (141),



des radicaux de plus haut poids moléculaire.

On s'est adressé, en particulier, à l' α -benzyl-dioxime (ATACK (4)) et l' α -furyl-dioxime (SOULE (134)).



SOULE signale que ce dernier réactif est, de tous ceux utilisés jusqu'alors pour la détection du nickel, de beau-

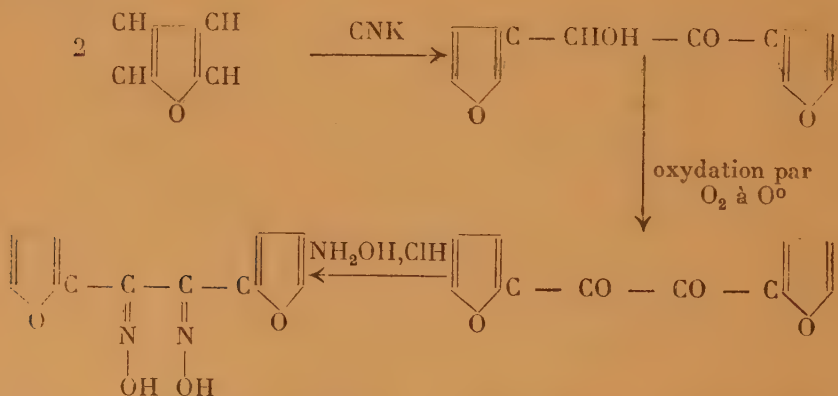
coup le plus sensible ; il permet de précipiter une quantité de nickel douze fois moindre que l' α -diméthylglyoxime.

Il m'a paru intéressant d'examiner si l' α -furyldioxime ne donne pas, avec le nickel tétravalent, une réaction colorée plus intense que celle de la diméthylglyoxime.

La méthode utilisée pour préparer l' α -furyldioxime fut celle suivie par SOULE, qui l'avait lui-même empruntée à FISHER (65). On condense deux molécules de furfurool par action de CNK en milieu hydroalcoolique, à ébullition. La cétone-alcool secondaire ainsi obtenue (furoïne) cristallise par refroidissement ; elle est lavée à l'eau et à l'alcool, et purifiée par dissolution dans le toluène, suivie de précipitation par l'alcool.

Sous l'action d'un courant d'air, à 0° et en milieu alcalin, le produit s'oxyde en dicétone (furyle) qui précipite et est purifiée par cristallisations dans l'alcool bouillant (aiguilles jaunes fondant à 162°). La dicétone α est finalement transformée en dioxime par action à froid et en milieu alcoolique du chlorhydrate d'hydroxylamine.

Le tableau suivant résume la marche théorique de la synthèse :



Pour éviter des pertes trop importantes par recristallisations successives, le furyle obtenu fut purifié par sublima-

tion dans le vide ; on obtient de la sorte, en une seule opération, un produit très pur, cristallisé en aiguilles jaunes et fondant à 162°.

L' α -furyl-dioxime est plus soluble dans l'eau que la diméthylglyoxime, aussi sa solution aqueuse peut-elle servir à l'étude de la détection du nickel.

De cette solubilité plus grande du réactif, on peut induire qu'il en ira de même du composé nickel-furyldioxime, dont la solubilité dans l'eau froide doit être plus grande que celle du nickel diméthylglyoxime ; effectivement, l'évaporation à sec des eaux-mères après précipitation du nickel et filtration, laisse toujours un léger résidu rouge-orangé de nickel furyldioxime.

De plus, la précipitation du nickel par le réactif est lente, surtout pour les faibles quantités de métal : il faut agiter longuement ou frotter les parois du tube avec une baguette de verre ; on obtient finalement un précipité rouge-orangé qui, examiné au microscope, s'est toujours révélé amorphe.

Mais le défaut le plus grave du réactif consiste dans la nécessité d'opérer en milieu assez fortement ammoniacal ; SOULE insiste, dans son mémoire (134), sur l'importance de cette concentration en ammoniaque : « avec trop peu d'ammoniaque, la réaction n'a pas lieu ; avec trop d'ammoniaque, le précipité se redissout ».

L' α -furyl-dioxime est donc d'un emploi très délicat pour la précipitation de traces de nickel, le moindre excès d'ammoniaque étant susceptible de causer des pertes très importantes. La réaction, enfin, n'est pas spécifique : des solutions très diluées de sels de fer précipitent sous l'action du réactif.

L'oxydation du complexe métallique par les hypobromites a bien lieu, pour le nickel furyldioxime. Il se développe une teinte jaune orangé dont le maximum d'intensité est à peu de chose près le même que pour le nickel diméthylglyoxime.

En définitive, il ressort de ces différents essais que

l' α -furyldioxime n'est pas plus avantageuse pour la recherche et le dosage du nickel, que la diméthylglyoxime couramment utilisée.

2. — DOSAGE DU CUIVRE

Le procédé de dosage du nickel, précédemment décrit, détermine l'ordre de grandeur des prises d'essai nécessaires à ce dosage. En tablant sur une teneur en nickel de 0 mg. 1 pour 1.000 grammes de matière fraîche d'après les chiffres publiés par G. BERTRAND et MACHEBŒUF (14), des prises d'essai de 50 grammes de matière fraîche seront suffisantes. La grandeur de ces prises d'essai conditionne la technique de dosage du cuivre qui devra être choisie ; d'après les analyses des différents auteurs, on peut estimer que ces 50 grammes renfermeront en moyenne 0 mg. 1 de cuivre ; cette teneur sera bien supérieure pour *Gryphea angulata* et pourra s'élever au-dessus du milligramme.

Deux réactions classiques du cuivre ont donc été adaptées au dosage colorimétrique à l'électrophotomètre :

— la réaction de l'eau céleste, pour des quantités de cuivre supérieures à 0 mg. 5 dans la prise d'essai,

— la réaction du ferrocyanure de cuivre, pour les teneurs inférieures.

L'étude de ces deux réactions a été faite d'une manière analogue à celle du nickel et sera brièvement résumée.

A. — ÉTUDE DE LA RÉACTION DE L'EAU CÉLESTE

Lorsqu'on ajoute à une solution diluée de sel de cuivre une quantité ménagée d'ammoniaque, on obtient d'abord un précipité d'hydroxyde $(OH)_2Cu$, précipité gélatineux,

bleu-clair, qu'un excès d'ammoniaque redissout en donnant une liqueur de coloration bleue intense.

1. — Influence de l'excès d'ammoniaque

On trouve dans la littérature les formules de plusieurs composés définis d'hydroxyde de cuivre et d'ammoniaque, ces composés se formant suivant les proportions relatives des deux constituants mis en présence.

Pratiquement, on ajoutera toujours un excès d'ammoniaque pour assurer la formation de l'hydroxyde double complètement saturé en ammoniaque.

Sur une solution renfermant 25 milligrammes de cuivre et amenée au volume final de 100 cc. a été étudiée l'influence des quantités croissantes d'ammoniaque concentrée et pure ($d = 0,69$), allant de 2 cc. à 50 cc. ; dans cet intervalle aucune variation de l'intensité de la coloration bleue obtenue n'a été observée.

2. — Influence de l'anion du sel de cuivre

Les chlorure, nitrate, sulfate de cuivre ont été essayés ; on n'a constaté aucune modification de l'intensité de coloration.

3. — Variation de l'intensité en fonction du temps

L'intensité maximum est atteinte en quelques secondes et la durée de conservation de la solution colorée est très grande, pratiquement illimitée.

4. — Spécificité et influence d'autres sels métalliques

La réaction n'est pas spécifique du cuivre ; le nickel et le cobalt donnent, dans les mêmes conditions, des hydroxydes

doubles, colorés et solubles dans l'ammoniaque. En combinant cette réaction avec un isolement préalable du cuivre à l'état de SCu en milieu chlorhydrique, on élimine ces deux seuls métaux susceptibles de fausser le dosage.

Mais d'autres éléments précipitant par SH_2 dans les mêmes conditions que le cuivre (plomb et étain, particulièrement) pouvant accompagner ce métal et donner, sous l'action de l'ammoniaque, des précipités d'hydroxydes troublant la liqueur en rendant impossible la mesure de l'opacité.

Comme ces éléments ne sont présents dans la matière vivante qu'en très faible proportion, on pourra facilement éliminer les quelques flocons d'hydroxyde formés par filtration sur un très petit filtre et lavage du précipité par quelques gouttes d'ammoniaque concentrée pour entraîner le cuivre fixé par absorption (*). Si le précipité formé était par trop volumineux, il faudrait avoir recours à une autre méthode d'isolement du cuivre, mais ce cas ne s'est jamais rencontré au cours des analyses qui seront décrites plus loin.

5. — Courbe d'étalonnage. Sensibilité et précision.

L'absorption a été mesurée dans trois couleurs : orangé ($\lambda = 0\mu 58$), rouge ($\lambda = 0\mu 65$), et vert ($\lambda = 0\mu 48$), le maximum d'absorption étant dans l'orangé.

Les courbes obtenues sont des droites ; la coloration, dans les limites utilisées pour le dosage, est donc proportionnelle à la quantité de cuivre.

On pourra doser dans 10 cc. de liquide des quantités de cuivre allant de 0 mg. 5 à 3 milligrammes. L'erreur systématique de l'appareil, soit une demi-division de l'échelle graduée correspond à 0 mg. 015 de cuivre.

(*) Il y a lieu d'utiliser un filtre de dimensions aussi réduites que possible, car la cellulose possède un pouvoir adsorbant non négligeable pour les liqueurs ammoniacales d'hydroxyde de cuivre.

Comme dans le cas du nickel, il est possible, par cette méthode colorimétrique, de faire des dosages de cuivre avec moins de 1 % d'erreur.

B. — ÉTUDE DE LA RÉACTION DU FERROCYANURE DE CUIVRE (*)

Dans les solutions diluées de sels de cuivre, le ferrocyanure de potassium donne suivant la concentration en métal, les conditions de pH et la présence ou l'absence d'électrolytes, un précipité brun ou une coloration brune de ferrocyanure de cuivre. Le ferrocyanure de cuivre constitue, en effet, un hydrosol, plus ou moins stable, et évoluant plus ou moins rapidement vers la maturation et la floculation, suivant les diverses conditions énumérées.

Le dosage colorimétrique du cuivre par cette réaction consiste à apprécier l'intensité de coloration de l'hydrosol limpide, et non pas l'opacité due à la présence, dans le liquide, de micelles plus ou moins volumineux ; il importe donc, tout d'abord, de déterminer les conditions de stabilité du sol de ferrocyanure de cuivre. Il est facile de comprendre que l'opacité totale du liquide est la somme de deux facteurs :

- opacité propre des micelles colloïdaux présents,
- opacité due à la coloration brune de l'hydrosol.

Ces deux facteurs peuvent varier en sens contraire, le grossissement des micelles augmentant l'opacité due au trouble du liquide et diminuant celle due à sa coloration. De ce fait, l'étude à l'électrophotomètre du comportement du colloïde en fonction du temps et du grossissement des micelles, est assez délicate ; il faut, de toute nécessité, éliminer

(*) Cette réaction a été adaptée au dosage du Cu par TASSILLY (139) à l'aide du spectrophotomètre de Fery.

l'un des deux facteurs et étudier exclusivement les variations de l'autre.

ÉTUDE DE L'OPACITÉ PROPRE DES MICELLES

Pour supprimer l'opacité due à la coloration du sol on effectue cette étude en lumière rouge ($\lambda = 0\mu65$). Pour cette longueur d'onde, l'absorption provoquée demeure très faible et pourra être négligée pour une étude pratique.

L'opacité due à la présence des micelles colloïdaux a été ainsi étudiée en fonction de l'évolution du colloïde dans le temps sous l'influence de divers facteurs : concentration en cuivre, excès de ferrocyanure de potassium, absence ou présence d'électrolytes ; les conclusions pratiques se dégageant des séries de mesures faites dans ces diverses conditions seront seules mentionnées ici :

a) *En l'absence d'électrolytes*

1) En solution très diluée, le colloïde est stable. Le liquide paraît limpide à l'œil, sous quelque incidence qu'on l'observe ; de fait, on constate à l'électrophotomètre que l'opacité propre de l'hydrosol (c'est-à-dire celle due à la présence des micelles) est très faible.

En outre, cette opacité ne varie pas dans le temps d'une manière sensible, les mesures ont porté sur un laps de temps d'environ six heures, mais le sol peut rester limpide durant plusieurs jours et même plusieurs semaines.

Donc, en solution diluée (soit une teneur inférieure ou égale à 0 mgr. 2 de cuivre dans 10 cc.), en l'absence d'électrolytes et d'un trop grand excès de ferrocyanure de potassium, l'hydrosol formé est stable et limpide, son opacité propre étant pratiquement nulle ; il faudra, pour réaliser

un dosage colorimétrique correct, chercher à se placer dans ces conditions.

2) Plus le sol est concentré en ferrocyanure de cuivre et moins il devient stable, son opacité propre augmente de plus en plus rapidement ; pour des concentrations élevées en cuivre (supérieures à 2 mgr. dans 10 cc.), la floculation est immédiate dès l'addition de ferrocyanure de potassium.

Tous ces essais ont été faits à un pH voisin de la neutralité.

b) *Action des électrolytes*

Ils interviennent, ainsi que l'excès de ferrocyanure de potassium, pour hâter la floculation.

ETUDE DE LA COLORATION DE L'HYDROSOL

Pour annuler l'opacité due aux micelles, on opère sur des solutions diluées de sel de cuivre, en se plaçant dans les conditions optima énumérées ci-dessus pour obtenir un hydrosol stable. Les mesures sont faites en lumière bleue et en lumière verte pour lesquelles l'hydrosol coloré en brun présente une absorption notable. Dans ces conditions, on constate :

— que le maximum d'intensité de coloration du ferrocyanure de Cu est atteint en quelques secondes ;

— que cette intensité ne varie pas dans le temps d'une façon sensible ;

— que l'intensité est proportionnelle à la concentration, pour les solutions diluées utilisées (quantités de cuivre inférieures ou égales à 0 mgr. 2 pour 10 cc.).

En résumé, tous les tableaux de chiffres obtenus au cours de cette étude peuvent se traduire par des courbes qui présentent toutes l'allure générale de la figure 2 (p. 46).

En AB, le ferrocyanure de cuivre se forme rapidement ; l'opacité due à la coloration brune qu'il communique au liquide augmente très vite et atteint son maximum en quelques minutes ; l'opacité due à la présence des micelles est à peu près nulle. BC représente la zone de stabilité de l'hydrosol : l'opacité due à la coloration a atteint son maximum ; l'opacité due aux micelles reste très faible.

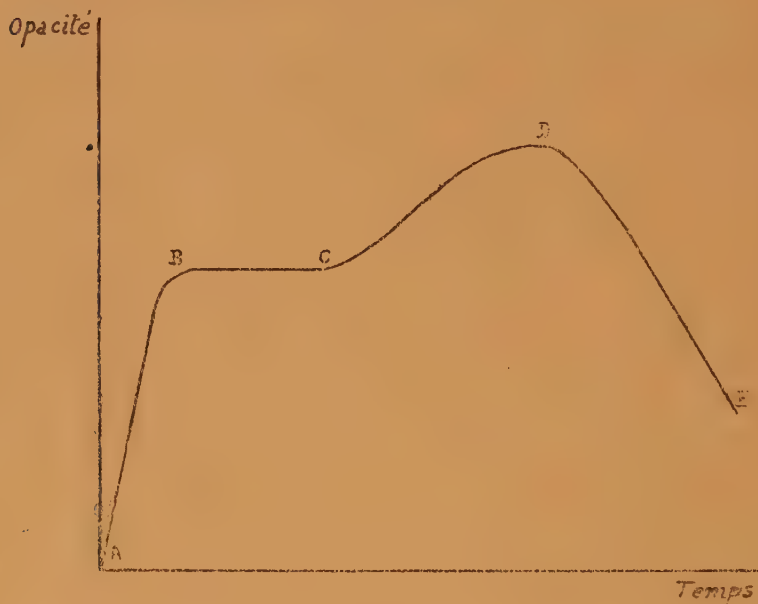


Fig. 2

En CD, le colloïde mûrit et évolue vers la floculation ; l'hydrosol se trouble par grossissement des micelles et l'opacité propre du colloïde augmente ; l'opacité de coloration de l'hydrosol tend à diminuer, mais la résultante correspond à une augmentation du pouvoir d'absorption du liquide.

La floculation a lieu en D ; en DE, le colloïde floculé précipite, se rassemble au fond de la cuve et le liquide se clarifie.

Le dosage colorimétrique ne pourra être correctement pratiqué tant que le colloïde sera au stade BC de son évolution. Or, s'il est vrai que la courbe présente toujours la même allure générale, les longueurs de ses différents éléments sont modifiées suivant les conditions opératoires ; on a vu plus haut les conditions optima pour que l'hydrosol se maintienne durant un temps très long au stade BC (faible concentration en cuivre et absence aussi complète que possible d'électrolytes).

Le pH devra toujours être ajusté au voisinage de la neutralité : en milieu acide, la formation de ferrocyanure de cuivre n'a pas lieu ; en milieu alcalin, il se forme un précipité d'hydroxyde de cuivre.

Pour éviter la présence d'un trop grand excès de ferrocyanure de potassium, on utilisera une solution aqueuse à 1 %, on ajoutera, pour 10 cc. de solution de cuivre, 0 cc. 1 de cette solution de ferrocyanure de K qui renferme 1 milligramme de sel, quantité plus que suffisante pour transformer les 0 mgr. 2 de cuivre que la solution contiendra au maximum.

Le cuivre devra être isolé à l'état de pureté, à cause de la perturbation produite par les électrolytes ; de plus, si la solution contenait des sels de métaux lourds, on aurait, lors de l'addition de ferrocyanure de K, formation de ferrocyanure insoluble, troublant le liquide et amorçant, en outre, la floculation immédiate du ferrocyanure de cuivre.

COURBE D'ÉTALONNAGE, SENSIBILITÉ ET PRÉCISION

L'étalonnage de l'électrophotomètre est effectué dans le bleu et dans le vert ; les deux courbes obtenues permettent de réaliser un contrôle facile de l'identité du cuivre.

On pourra doser, dans 10 cc. de liquide, de 0 mgr. 01 à 0 mgr. 2 de Cu ; l'erreur systématique sera, dans ces condi-

tions, de 0 mgr. 001 de cuivre ; elle donne la possibilité de faire des mesures à 1 % près.

3. — DOSAGE DU COBALT

La difficulté du dosage de ce métal tient à deux causes principales : tout d'abord, l'extrême petitesse du taux de cobalt dans la matière vivante ; si l'on se reporte au tableau d'ensemble de G. BERTRAND et MACHEBŒUF, on voit que ces quantités sont inférieures à celles de nickel : sa dispersion dans les êtres vivants est de 10^{-7} à 10^{-8} du poids de matière fraîche. En second lieu, le problème du dosage est encore compliqué du fait de l'absence de réaction spécifique du cobalt, douée d'une sensibilité suffisante. Il ne saurait être question, en effet, d'utiliser le dosage pondéral à l'état de sel de Fisher ; les prises d'essai contiendront au plus quelques millièmes de milligramme de métal, et une réaction colorimétrique sera seule utilisable.

TSCHUGAEFF (141), en 1909, signala que les sels de cobalt divalent donnaient avec la diméthylglyoxime des combinaisons solubles, intensément brunes ; FEIGL et TUSTANOWSKA (62) indiquèrent qu'on pouvait augmenter la sensibilité de cette réaction en opérant en présence de sulfures. C'est une telle réaction qu'utilisent G. BERTRAND et MACHEBŒUF pour le dosage colorimétrique du cobalt chez les animaux, à l'aide d'une gamme-étalon préparée avec de petits tubes à essai de faible diamètre ; mais si l'on utilise l'électrophotomètre, l'obligation d'amener le liquide coloré à 10 cc. rend la méthode inapplicable ; dans de telles conditions, il est impossible, en effet, de déceler une quantité moindre que 10 γ de cobalt.

Parmi d'autres réactions sensibles, basées sur l'emploi de la diméthylglyoxime, on peut citer celle décrite par CHAROTTINE (42) : sous l'action de diméthylglyoxime et de ben-

zidine, le cobalt donne une coloration rose, sensible (on pourrait déceler 1γ dans 10 cc.).

On a utilisé également la formation de sulfocyanure double de cobalt et de mercure pour des essais à la touche (KUHLBERG (89)).

L'un des réactifs qui ait donné lieu aux recherches les plus nombreuses est l' α -nitroso- β -naphtol, qui a été utilisé, soit comme réactif pour dosage colorimétrique (JONES (81)) en opérant en présence de citrate d'ammoniaque et d'ammoniaque, soit, le plus souvent comme réactif de précipitation, en opérant en milieu acétique : MAYA et FEIGL (104), MAYA (103), PHILIPPOT (121), etc.

Enfin, KIDSON, ASKEW et DIXON utilisent pour la détection du cobalt dans les sols, plantes et tissus des moutons de la Nouvelle-Zélande, une réaction colorée basée sur l'emploi du sel R (acide naphtol-disulfonique-2-3-6) (86) ; STARE et ELVEHJEM (136) avaient eu recours également à cette réaction qui a été étudiée tout récemment par MACPHERSON et STEWART (99).

ADAPTATION DE LA RÉACTION A L' α -NITROSO- β -NAPHTOL AU DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU COBALT

En solution acétique, l' α -nitroso- β -naphtol se combine aux sels de cobalt ; on obtient, suivant la concentration, un précipité brun ou une coloration rouge-brun, très sensible, permettant de déceler facilement 1γ dans 10 cc. de liquide (87). Le composé formé est soluble dans le chloroforme et, par deux ou trois épuisements, on obtiendra une solution chloroformique limpide, sur laquelle il sera aisé de faire des déterminations colorimétriques.

Mais la solution acétique d' α -nitroso- β -naphtol est elle-

même douée d'une coloration jaune intense et soluble dans le chloroforme, ce qui constitue un inconvénient sérieux. Lorsqu'on mesurera à l'électrophotomètre l'opacité de la solution chloroformique, on dosera, en effet, la somme : nitroso- β -naphtol libre et nitroso- β -naphtol combiné au cobalt. Par suite, la quantité de réactif introduite devra être exactement mesurée et la moindre erreur dans cette mesure faussera considérablement le dosage. En outre, du fait que le point de départ est une solution colorée, l'intervalle de concentrations dans lequel sera utilisable l'électrophotomètre, se trouve beaucoup plus réduit.

Il est cependant possible de tourner la difficulté. En étudiant la formation du composé d' α -nitroso- β -naphtolate de cobalt en fonction du pH, on peut constater que, à partir d'une certaine alcalinité du milieu, le réactif (qui est passé à l'état d' α -nitroso- β -naphtolate alcalin) cesse d'être soluble dans le chloroforme ; le composé correspondant de cobalt, au contraire, reste soluble dans ce solvant grâce auquel il peut être totalement enlevé à la phase aqueuse qui retient l'excès de réactif.

L'étude pratique a été réalisée avec un réactif consistant en une solution à 1 % d' α -nitroso- β -naphtol, dans de l'acide acétique à 25 %. Dans 10 cc. d'eau, on introduisait 0 cc.5 de ce réactif et des quantités déterminées de soude dix fois normale, après quoi le mélange était vigoureusement agité avec du chloroforme, et les extraits chloroformiques amenés à 10 cc. étaient examinés à l'électrophotomètre.

Lorsque l'alcalinité du milieu est supérieure ou égale à 0 cc. 5 de la solution de soude utilisée, l' α -nitroso- β -naphtol est insoluble dans le chloroforme et ce dernier ne présente pas, après avoir épuisé la phase aqueuse, une opacité plus grande que le chloroforme pur.

Si la même expérience est faite, non plus sur de l'eau distillée, mais sur 10 cc. de solution renfermant quelques millièmes de milligramme de cobalt, on constate que le chlo-

roforme entraîne l' α -nitroso- β -naphtolate de cobalt et est coloré en rose ; on continue les épuisements, en agitant fortement, jusqu'à ce que le chloroforme reste incolore, la phase aqueuse étant colorée en jaune vif par l'excès de réactif ; on mesure à l'électrophotomètre l'opacité de l'extrait chloroformique, complété à 10 cc. La réaction ainsi pratiquée est très sensible et 1 γ de cobalt suffit à donner aux 10 cc. de chloroforme une teinte rose très nettement perceptible.

1. — Influence de l'excès de soude

La quantité de soude nécessaire pour maintenir l' α -nitroso- β -naphtol dépend de la teneur en acide acétique du réactif utilisé, il faut qu'il reste, après saturation de l'acide, une quantité suffisante de soude libre.

L'excès de soude n'exerce pas d'influence sur la coloration de la solution chloroformique d' α -nitroso- β -naphtolate de cobalt :

Soude 10 N ajoutée.	Absorption pour 5 γ de Co	
	Dans le bleu	Dans le vert
0 cc. 5	73	54
1 cc.	73	54,5

Mais, avec de fortes concentrations en soude, la combinaison colorée du cobalt est plus difficilement entraînable par le chloroforme. Dans la pratique, on déterminera la quantité optimum donnant toute sécurité quant à la non-solubilité du réactif dans le chloroforme et permettant un entraînement facile du complexe coloré (*).

(*) On pourra également, d'après ces données, préparer d'avance une solution sodique d' α -nitroso- β -naphtol de titre convenable.

2. — Evolution de la coloration du complexe dans le temps

Plusieurs séries de mesures ont été exécutées avec des quantités variables de cobalt, de 1 à 10 γ . L'étude a porté sur un laps de temps de deux heures et aucune modification n'a été observée. Ce point est très important à noter et permettrait, le cas échéant, de reconnaître si le cobalt est accompagné d'autres métaux donnant des combinaisons avec l' α -nitroso- β -naphtol.

3. — Etalonnage de l'appareil, sensibilité et précision du dosage

L'étalonnage de l'électrophotomètre se fait en lumière bleue et en lumière verte ; on obtient deux droites — (l'intensité de coloration du complexe est proportionnelle à sa concentration, pour ces grandes dilutions) — qui font entre elles un angle caractéristique de la coloration mesurée et permettent, comme on l'a vu, d'identifier celle-ci.

On pourra, en amenant la solution chloroformique à 10 cc., déceler de 0 γ 5 à 10 γ de cobalt. L'erreur systématique est de 0 γ 05 et l'erreur relative pourra être inférieure à 1 %.

4. — Réactions colorées données par quelques autres métaux

La réaction à l' α -nitroso- β -naphtol n'est malheureusement pas spécifique du cobalt ; d'autres éléments seront susceptibles de se combiner au réactif et, bien que les réactions qu'ils fournissent soient moins sensibles que celle du cobalt, ils pourront en gêner le dosage, si ce métal n'a pas été isolé à un état de pureté suffisant.

Le cuivre donne avec le réactif, et dans les mêmes conditions que le cobalt, une coloration dont l'intensité est dix fois moindre environ que celle de ce dernier métal. Il est

facile de distinguer les deux teintes, celle du cuivre tirant davantage sur le jaune et se décolorant d'une façon très rapide. Le cuivre ne gênerait donc la recherche du cobalt qu'en proportion peu considérable : une précipitation par l'hydrogène sulfuré, en milieu chlorhydrique, suffira pour l'éliminer.

Le fer et le manganèse ne donnent, dans les conditions d'emploi du réactif, que des teintes peu sensibles ; une précipitation préalable par l'ammoniaque les éliminera de façon satisfaisante.

On peut remarquer que la réaction au sel R. nitrosé qui a été utilisée par différents auteurs au cours de ces dernières années n'est pas davantage spécifique du cobalt ; d'après l'étude de MACPHERSON et STEWART (99), le cuivre et le fer gênent, ainsi que le manganèse, si ces métaux sont présents en grande proportion.

4. — DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU FER

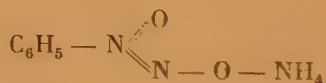
On a proposé, dans le cours de ces dernières années, plusieurs méthodes colorimétriques, destinées à réaliser le dosage du fer à partir d'une prise d'essai minime de substance organique. On peut citer, parmi ces techniques : la formation de bleu de Prusse dans des conditions déterminées, qui fut étudiée par MAQUENNE (110) et appliquée par WANG-TAÏ-SI au dosage du fer dans les mollusques (145) ; la formation de sulfocyanure ferrique fut également adaptée au dosage colorimétrique par plusieurs auteurs (138). Enfin, diverses techniques ont été publiées utilisant des réactifs organiques, tels que l' α - α' -dipyridile (37), l'acide sulfosalicylique, étudié par ALTEN, WEILAND et HILLE (1), puis par KORENMAN (88), et récemment la 8-hydroxyquinoléine, utilisée par LAVOLLAY (90) et qui permet de doser quelques millièmes de milligrammes de fer.

Pour plusieurs de ces méthodes, la présence dans le milieu d'une certaine quantité de phosphates nuit à l'exactitude du dosage ; aussi, avant d'entreprendre le dosage du fer dans les cendres des mollusques, fallait-il séparer le métal des phosphates qui l'accompagnaient en quantités importantes. Dans ce but, je me suis adressé au cupferron. P. MEUNIER (109 *bis*) signale, en effet, que le cupferron permet une précipitation totale du fer, même en présence de phosphates ; pour isoler le fer, cet auteur met à profit la solubilité dans le chloroforme du complexe formé, au lieu d'utiliser une filtration qui s'avère très laborieuse.

En étudiant cet isolement du fer par le cupferron, je me suis aperçu que la solution chloroformique du complexe, qui est colorée, pouvait, si l'on prend soin de préciser certaines conditions opératoires, servir de base à une méthode simple et précise de dosage colorimétrique du fer.

ÉTUDE DE LA RÉACTION AU CUPFERRON

Le cupferron, sel de ammonium de la nitroso-phénylhydroxylamine, découvert par BAUDISCH (6) et répondant à la formule :



précipite quantitativement les sels ferriques. La combinaison formée est colorée et sa teinte varie du jaune au rouge, suivant la concentration en fer ; sa solubilité dans le chloroforme permet de la soustraire totalement à la phase aqueuse.

Le cupferron ne précipite pas spécifiquement le fer ; plusieurs autres métaux peuvent donner des combinaisons analogues, mais la précipitation de ces combinaisons est fonction du pH du milieu. PINKUS et MARTIN (123) ont étudié et pré-

cisé cette action du pH et ont reconnu que si l'on opère en pH inférieur à 1,8, les seuls métaux susceptibles de donner des complexes insolubles sont : le fer, le molybdène, le titane, l'étain, le cuivre et le vanadium ; il faudra donc étudier l'influence possible de ces métaux sur le dosage du fer.

Jusqu'ici, le cupferron n'a été utilisé que comme agent de précipitation du fer en vue de son dosage pondéral et volumétrique ; sans doute, l'instabilité fréquemment observée de la coloration du complexe ferrique a-t-elle gêné les applications colorimétriques. C'est, en effet, un réactif très instable, qui s'altère rapidement à l'air, en donnant naissance à des produits nitrés ; sa solution aqueuse, à peine teintée lorsqu'elle est récente, brunit assez rapidement. Enfin, le complexe ferrique jaune vire au vert en solution chloroformique, dans un temps parfois assez court ; le cupferron lui-même, qui est séparé de sa base ammoniacale sous l'action de l'acide du milieu et rendu ainsi soluble dans le chloroforme, donne avec ce solvant une solution incolore qui vire au vert plus ou moins vite.

Il ne sera possible de faire un dosage colorimétrique du complexe ferrique que si ce dernier, en solution chloroformique, reste stable pendant un temps suffisant pour permettre, avec sécurité, une mesure correcte à l'électrophotomètre.

ADAPTATION AU DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU FER

1. — Influence de l'acide utilisé

On a vu que pour rendre la précipitation du fer plus sélective, il était nécessaire d'acidifier assez fortement le milieu ; divers acides ont été essayés à des concentrations N,

N/5 et N/10 et, après quelques minutes de contact, le cupferron libéré était entraîné au chloroforme.

Avec les acides chlorhydrique ou nitrique, on observe un verdissement rapide de la solution chloroformique ; cette dernière, au contraire, reste stable pendant un temps assez long (une heure ou plus), lorsque le milieu est acidifié avec l'acide sulfurique ; c'est donc ce dernier qu'il convient de choisir ; il va sans dire qu'il faudra opérer à froid et éviter toute élévation de température qui amènerait une décomposition totale du cupferron.

2. — Influence de l'oxydant ajouté

Le fer ne précipite quantitativement que s'il est amené à l'état ferrique ; il convient donc de faire la réaction en milieu oxydant. Divers oxydants ont été essayés, selon le mode opératoire précédemment décrit, en se plaçant toujours en milieu sulfurique normal.

On vient de voir que l'acide nitrique est inutilisable ; de même, le permanganate amène une décomposition rapide du réactif.

L'eau oxygénée, au contraire, constitue un excellent agent d'oxydation des sels ferreux et ne décompose pas sensiblement le cupferron, dont la solution chloroformique reste incolore pendant au moins une heure.

3. — Influence de la quantité de cupferron ajoutée au milieu

Ces essais ont été faits en milieu sulfurique normal, rendu oxydant par cinq gouttes d'eau oxygénée à 12 volumes.

Le tableau suivant indique les chiffres d'absorption, en lumière bleue, de la solution chloroformique de cupferron extraite de la phase aqueuse après cinq minutes de contact et trois épuisements. Le cupferron était ajouté en solution

aqueuse, récente, à 5 % ; les mesures ont porté sur une durée de deux heures.

Quantité de solution de cupferron ajoutée			
Temps en minutes	Absorption		
	0 cc. 5	1 cc.	2 cc.
0	22	21	23
5	22	21	23
10	22	21	23
15	22	21	25
30	22	21	31
45	22	22	66
60	22	24	85
120	22	75	<100

On devra donc éviter la présence d'un trop grand excès de cupferron et s'en tenir pratiquement au chiffre maximum de 0 cc. 5 de solution à 5 % (soit 25 milligrammes de cupferron), quantité qui permet de précipiter intégralement les traces minimales de fer dosables par cette méthode.

4. — Technique de la réaction

On opérera de la façon suivante : à la solution acide contenant le fer, on ajoutera quelques gouttes d'eau oxygénée et 0 cc. 5 d'une solution aqueuse récente de cupferron à 5 %. Après agitation, on ajoutera du chloroforme et on entraînera le complexe par épuisement. On fera ainsi trois épuisements et, lors du dernier, on ajoutera une ou deux gouttes de solution de cupferron pour s'assurer que tout le fer a été précipité et entraîné. La liqueur chloroformique obtenue sera amenée à 10 cc. et sa coloration sera mesurée immédiatement à l'électrophotomètre.

En opérant de cette manière, la teinte jaune obtenue reste toujours stable pendant une heure environ ; passé ce temps, le chiffre d'absorption varie, la solution prenant alors généralement une coloration verte plus ou moins accusée.

Il est à remarquer que la présence d'eau oxygénée est indispensable pour assurer à la coloration du complexe ferrique la stabilité dont il vient d'être parlé ; en son absence, la solution chloroformique se trouble et change de teinte très rapidement.

5. — pH optimum de la réaction

La réaction doit être pratiquée en pH égal ou inférieur à 1,8 ; à quel pH convient-il de se placer exactement ?

On évitera de se placer trop près de la limite, ce qui pourrait provoquer des précipitations partielles d'autres éléments (aluminium, chrome, etc.) ; l'étude a été faite uniquement sur des solutions aqueuses dont la teneur en acide sulfurique allait de la concentration N/20 à la concentration N/5.

Pour toutes ces liqueurs, étudiées d'abord avec le cupferron seul et l'eau oxygénée, dans les conditions précisées plus haut, la valeur de l'absorption est restée la même pendant deux heures ; et cette valeur était identique à celle donnée par le chloroforme pur.

L'étude de ces mêmes liqueurs a ensuite été faite en présence de fer ; dans ces conditions, la couleur de la solution chloroformique du complexe est restée stable pendant une heure environ, pour toutes les concentrations ; mais l'entraînement du complexe par le chloroforme étant moins facile lorsque la liqueur est peu acide, il conviendra d'utiliser pour les dosages un milieu sulfurique normal.

6. — Etalonnage de l'électrophotomètre.

Sensibilité et précision du dosage.

L'appareil est étalonné à l'aide d'une solution exactement titrée de sel de fer, en suivant la technique décrite pour l'obtention de la solution chloroformique du complexe.

L'absorption est mesurée dans le bleu et dans le vert. Les

intensités de coloration étant proportionnelles aux concentrations en fer, on obtient deux droites dont l'angle servira au contrôle du dosage (une solution altérée et colorée en vert présente un décalage avec augmentation d'absorption dans le bleu par rapport au vert).

On pourra ainsi doser de 2 γ à 50 γ de fer, avec une erreur systématique de 0 γ 04.

7. — Influence des phosphates

La précipitation du fer est quantitative en présence de phosphates, si l'on a soin d'agiter fortement la solution, après addition de cupferron, pour favoriser la formation du complexe.

Les essais suivants ont été faits en présence de 1 gramme de phosphate disodique.

Fer ajouté	Fer retrouvé	Erreur relative %
50 γ	50 γ 2	+ 0,4
40 γ	39 γ 6	— 1
20 γ	19 γ 8	— 1
10 γ	9 γ 6	— 4

8. — Influence des autres métaux

On a vu que d'autres métaux pouvaient être précipités par le cupferron en pH inférieur à 1, 8.

Le molybdène, le titane et l'étain donnent avec ce réactif des combinaisons incolores ou à peine teintées de jaune (pour le titane) ; pratiquement, ils ne gêneront pas le dosage. En effet, il est possible de doser intégralement le fer en présence

de quantités relativement importantes de ces métaux, comme en fait foi l'essai suivant :

Fer ajouté :	45 γ	Fer retrouvé :	45 γ 6
en présence de :	200 γ d'étain		
	100 γ de molybdène		
	20 γ de titane.		

Ces trois éléments, qui sont peu abondants dans la matière vivante, n'introduiront donc qu'une erreur tout à fait négligeable.

Le cuivre donne une combinaison verte dont l'intensité de coloration est cinquante fois moindre que celle du composé ferrique. Cette remarque, jointe au fait que le fer est plus abondant que le cuivre chez les êtres vivants, suffit à faire comprendre qu'on pourra, dans la presque totalité des cas, négliger également l'erreur due au cuivre. Il serait d'ailleurs très facile d'éliminer ce métal, en précipitant le fer par l'ammoniaque, en présence de phosphates (cette précipitation est intégrale) ; mais une telle précaution sera, la plupart du temps, inutile.

La vanadium, enfin, se combine au cupferron en donnant un complexe de couleur rouge, qui vire assez rapidement au jaune ; l'intensité de coloration de ce composé est, à peu de chose près, identique à celle du composé ferrique. Mais le vanadium est un élément extrêmement peu abondant chez les êtres vivants et on pourra, étant donnée la petitesse des prises d'essai nécessaires au dosage du fer, négliger totalement la perturbation que sa présence éventuelle pourrait causer au dosage.

On voit, en résumé, que la technique de dosage colorimétrique du fer, telle qu'elle vient d'être précisée, est applicable directement sur le résidu de destruction de la matière vivante qu'il suffira de mettre en solution d'acidité convenable. Si cette destruction a été faite par voie humide (sulfonitrique ou sulfonitroperchlorique), il conviendra d'éli-

miner du milieu les réactifs oxydants utilisés qui seraient susceptibles de décomposer le cupferron ; pour cela, on chauffera fortement le résidu sulfurique, à la fin de la destruction. Après refroidissement, ce résidu sera dilué, puis neutralisé exactement par l'ammoniaque ; on se replacera alors en milieu d'acidité convenable pour effectuer le dosage colorimétrique.

CHAPITRE III

ISOLEMENT DES MÉTAUX A PARTIR D'UN MÉLANGE COMPLEXE

Il faut maintenant étudier comment les techniques de dosage, précédemment établies à partir de solutions pures, pourront être adaptées au dosage des éléments, à partir du mélange très complexe constitué par le résidu minéralisé de la matière vivante.

Pour réaliser ce dosage, il est nécessaire d'isoler chacun des métaux dans un état de pureté suffisant pour que la réaction colorée utilisée présente un caractère rigoureux de spécificité et qu'en outre aucun des autres éléments accompagnant éventuellement l'élément dosé n'ait sur cette réaction d'influence perturbatrice.

Les méthodes classiques de chimie analytique sont le plus souvent inefficaces, en raison de la très faible teneur des éléments à doser et particulièrement pour le cas du nickel et du cobalt, où il importe d'isoler sans pertes des quantités de l'ordre du millième de milligramme.

Deux techniques paraissent seules répondre à ce but :

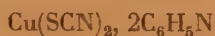
1. — La méthode au zincate de calcium de Gabriel Bertrand et M. Javillier (13) ;

2. — La technique de Spacu à la pyridine et au sulfocyanure d'ammonium (135).

Cette dernière méthode permet de séparer en bloc le cuivre, le nickel, le cobalt et le zinc à l'état de complexe avec la py-

ridine et le sulfocyanure. Ces complexes, insolubles dans l'eau et solubles dans le chloroforme, peuvent être séparés par filtration ou épuisement au chloroforme.

La filtration ne permettra jamais un isolement total des métaux, car la solubilité dans l'eau des complexes du type



n'est pas négligeable (voir à ce sujet les remarques de GOLSE (68)). Quant à l'épuisement au chloroforme, s'il constitue une excellente méthode d'isolement lorsque les solutions renferment quelques centièmes de milligrammes des métaux, il est très laborieux à réaliser lorsque le liquide n'en contient plus que 1 ou 2 γ .

La technique de SPACU ne paraît donc pas présenter d'avantages sur la méthode au zincate de calcium.

ADAPTATION DE LA MÉTHODE AU ZINCATE DE CALCIUM DE GABRIEL BERTRAND ET JAVILLIER, AU MICRO-DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU CUIVRE, DU NICKEL ET DU COBALT A PARTIR D'UN MÉLANGE COMPLEXE.

Mise au point primitivement par MM. G. BERTRAND et JAVILLIER (13) pour permettre un dosage précis du zinc dans les végétaux, cette technique fut étendue par la suite par G. BERTRAND et MOKRAGNATZ (19 *bis*), puis G. BERTRAND et MACHEBŒUF (14) au dosage du nickel et du cobalt dans les animaux et les végétaux après qu'il eût été reconnu (19) qu'elle permettait d'isoler ces deux éléments aussi facilement et aussi complètement que le zinc. Mais ces auteurs dosaient des quantités de nickel et de cobalt qui atteignaient généralement le milligramme, dans le cas des plantes, et le centième de milligramme dans le cas des animaux. Il importe donc, avant tout, d'examiner si la précipitation par la chaux — principe de la méthode au zincate de calcium — est sus-

ceptible d'entraîner, sans aucune perte, des quantités de nickel et de cobalt de l'ordre du millième de milligramme.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE LA TECHNIQUE

On part du résidu minéralisé de la matière organique obtenue soit par voie sèche (cendres), soit par voie humide (destruction sulfonitrique, par exemple). La silice contenue dans le mélange aura été insolubilisée par chauffage au-dessus de 100° . Le produit sec est alors repris par quelques centimètres cubes d'eau acidulée par l'acide chlorhydrique.

1. — ÉLIMINATION DU FER, DU MANGANÈSE ET DE L'ION (PO_4)

La liqueur faiblement chlorhydrique est versée dans un excès d'ammoniaque renfermant une trace d'oxydant (on utilise généralement l'eau oxygénée) et un peu d'eau de chaux. Il se forme immédiatement un précipité abondant, floconneux, et qui renferme :

- a) le fer, précipité à l'état d'hydroxyde ferrique $(\text{OH})_3\text{Fe}$;
- b) le manganèse, précipité à l'état d'hydroxyde $(\text{OH})_3\text{Mn}$;
- c) l'ion phosphorique, précipité à l'état de phosphates (Ca, Fe, ...).

Le cuivre, le zinc, le nickel et le cobalt sont restés en solution, les hydroxydes donnant avec l'ammoniaque des complexes solubles. Il est donc très important que le milieu dans lequel on opère cette première séparation contienne une forte proportion d'ammoniaque libre ; si la quantité en était insuffisante, on pourrait avoir des pertes plus ou moins importantes, voire même totales, des quatre métaux.

On aura intérêt à opérer de telle manière que le milieu renferme finalement une teneur en ammoniaque voisine de 20 % de la solution concentrée d'ammoniaque utilisée ($D = 0,69$).

2. — LAVAGE DU PRÉCIPITÉ

Le précipité colloïdal formé, généralement assez abondant, est susceptible de retenir par adsorption des quantités non négligeables des métaux maintenus en solution ammoniacale, et un lavage très soigneux s'impose.

Après avoir laissé déposer durant quelques heures, on centrifuge le mélange et la liqueur ammoniacale surnageante est versée dans une fiole conique. Le précipité est délayé dans un peu d'eau, redissous dans le minimum d'acide chlorhydrique, puis reprécipité par l'ammoniaque, dans des conditions identiques à la première opération.

Pour éviter l'addition d'un trop grand excès d'acide chlorhydrique, qui formerait avec l'ammoniaque du chlorure d'ammonium gênant et qu'il faudrait éliminer ensuite, on aura intérêt à opérer cette redissolution du précipité en présence d'un indicateur (phtaléine du phénol).

Après quelques heures, on centrifuge de nouveau le précipité formé et la liqueur ammoniacale est réunie à la première dans la fiole conique.

On a ainsi pratiquement amené en solution ammoniacale la totalité du cuivre, du zinc, du nickel et du cobalt, contenus dans la liqueur primitive ; l'expérience montre qu'un deuxième lavage du précipité, par redissolution dans l'acide chlorhydrique et reprécipitation par l'ammoniaque, n'est généralement pas nécessaire.

Quant au précipité, il contient la totalité du fer à l'état d'hydroxyde et de phosphate ferrique, ainsi que tout le manganèse.

3. — PRÉCIPITATION DU CUIVRE, DU ZINC, DU NICKEL ET DU COBALT PAR $(OH)_2Ca$

La liqueur ammoniacale, colorée en rose par addition de quelques gouttes de solution alcoolique de phtaléine du

phénol, est portée à ébullition ; d'abondantes vapeurs d'ammoniac se dégagent et le liquide se décolore (acidification du mélange par dissociation du chlorure d'ammonium formé lors de la précipitation).

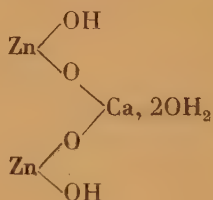
On ajoute alors de petites quantités de lait de chaux pour rendre la liqueur alcaline et on continue ces additions jusqu'à ce que le liquide reste alcalin, même après une ébullition prolongée.

A ce moment, tout l'ammoniac a été chassé ; les sels ammoniacaux formés par double décomposition lors de la précipitation du fer, du manganèse et des phosphates ont été dissociés et transformés en sels de calcium. On vérifiera à l'aide d'un papier de tournesol ou d'une goutte de réactif de NESSLER, que les vapeurs ne contiennent plus aucune trace d'ammoniac.

Pendant toute la durée de l'ébullition, il faudra ajouter de temps à autre de petites quantités d'eau distillée au liquide, pour éviter une trop grande concentration.

Finalement, on aura une liqueur contenant tous les sels alcalins de la liqueur primitive et un précipité renfermant, avec un excès de chaux, la totalité du zinc, du cuivre, du nickel et du cobalt.

Le zinc a été précipité à l'état de zincate de calcium cristallisé (9).



Pour le cuivre, le nickel et le cobalt, on ne sait pas avec certitude s'ils sont précipités à l'état d'hydroxydes ou s'ils forment des combinaisons analogues au zincate de calcium (19).

Il est nécessaire d'insister sur l'importance d'utiliser de

la chaux non carbonatée ; dans le cas contraire, le déplacement de l'ammoniaque est très laborieux, et on obtient un volume abondant de précipité formé en majeure partie de carbonate de calcium, qui exige pour sa dissolution une certaine quantité d'acide chlorhydrique, d'où dilution de la liqueur sur laquelle seront pratiquées les opérations analytiques ultérieures.

Valeur de cette précipitation. — Gabriel BERTRAND, au cours de l'étude du zincate de calcium (9), montra qu'une quantité de zinc de 0 mgr. 03 par litre pouvait être retrouvée totalement par ce procédé, qui constitue par conséquent une des meilleures méthodes d'isolement du zinc, actuellement connues.

Plus tard, étendant la technique au nickel et au cobalt, G. BERTRAND et MOKRAGNATZ (19) montrèrent que la précipitation de ces métaux par la chaux était également intégrale, et ils donnent les chiffres suivants :

	Après séparation ammoniacal-calcique en grammes	Sans séparation, en grammes
Cuivre	0,0048 0,0246	0,0049 0,0244
Nickel	0,0047 0,0238 0,0475 0,0946	0,0047 0,0241 0,0475 0,0946
Cobalt	0,0044 0,0227	0,0044 0,0229

Mais en va-t-il de même lorsque le liquide ne renferme plus que quelques γ de ces métaux ?

a) Précipitation du nickel

Une quantité connue de sel de nickel est introduite dans 100 cc. de liqueur ammoniacale, de concentration identique

à celle utilisée pour le traitement des cendres. On porte à ébullition et on ajoute un peu de chaux en présence de phtaléine. Après le départ total de NH_3 , le précipité est centrifugé, dissous dans un peu de ClH et évaporé à sec. Sur ce résidu, on dose le nickel par la technique colorimétrique précédemment décrite.

Tous les réactifs doivent être vérifiés et être exempts de nickel, ainsi que l'eau bidistillée utilisée.

Nickel introduit en γ	Nickel retrouvé en γ	Erreur relative %
32	32	0
24	23,75	— 1,05
16	15,9	— 0,62
12	12	0
7,2	7,2	0
6	6	0
4,8	4,75	— 1,04
3,6	3,65	+ 1,4
2,4	2,42	+ 1,05
1,8	1,82	+ 2,75
1,2	1,175	— 2,1

La précipitation du nickel, même en quantités très faibles, peut être considérée comme intégrale, l'erreur relative restant toujours dans les limites de l'erreur systématique.

b) Précipitation du cobalt

En suivant une technique identique à celle décrite pour le nickel, on aboutit aux résultats suivants :

Cobalt ajouté en γ	Cobalt retrouvé en γ	Erreur relative %
8	7,9	— 1,25
5	5,1	+ 2
2	1,95	— 2,5
1	1,05	+ 5

La précipitation du cobalt peut donc, elle aussi, être considérée comme totale.

c) Précipitation du cuivre

On opère de même sur 100 cc. de liquide. Le précipité formé par la chaux, recueilli par centrifugation, est dissous dans quelques centimètres cubes d'acide chlorhydrique normal, puis traité par un courant d'hydrogène sulfuré. Le précipité de sulfure est dissous dans une trace d'eau régale et, après évaporation à sec, on fait le dosage colorimétrique au ferrocyanure.

On vérifie donc en même temps la valeur de la précipitation par la chaux et par l'hydrogène sulfuré.

Cuivre ajouté en mgr.	Cuivre retrouvé en mgr.	Erreur relative %
0,200	0,200	0
0,175	0,174	— 0,57
0,150	0,152	+ 1,5
0,100	0,099	— 1
0,050	0,052	+ 4
0,025	0,026	+ 4

d) Conclusion

Comme contrôle supplémentaire, j'ai recherché s'il était possible de mettre en évidence dans la solution, après précipitation par la chaux, des traces de chacun des trois métaux ; en aucun cas, il n'a été possible d'en déceler des quantités mesurables à l'électrophotomètre.

La précipitation de traces de nickel, de cobalt et de cuivre par un excès d'hydroxyde de calcium peut donc être considérée comme intégrale.

4. — Isolement et dosage du cuivre

Le précipité renfermant, mêlés à un excès de chaux, tout le cuivre, le zinc, le nickel et le cobalt contenus dans le produit analysé, est recueilli par centrifugation et lavé avec quelques centimètres cubes d'eau de chaux. On centrifuge de nouveau et on le dissout dans l'acide chlorhydrique normal.

La liqueur, qui doit présenter une franche acidité ($\text{pH} < 2$) est alors chauffée à commencement d'ébullition et on précipite le cuivre par un courant d'hydrogène sulfuré (pour réaliser une bonne précipitation on opère sous une faible pression d'hydrogène sulfuré).

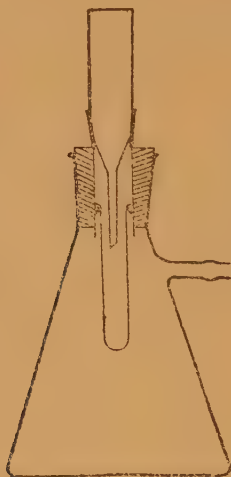


Fig. 3

Après un repos de quelques heures, on filtre pour séparer le sulfure de cuivre formé.

Pour faciliter les opérations ultérieures (lavage et redissolution du précipité), il y a intérêt à pratiquer cette filtration sur un petit filtre d'amiante, analogue au filtre servant à

recueillir l'oxyde cuivreux dans le procédé classique de dosage des sucres de G. BERTRAND.

La liqueur chlorhydrique filtrée est recueillie dans la fiole à vide ; on lave le précipité avec quelques gouttes d'eau acidulée par l'acide chlorhydrique et saturée d'hydrogène sulfuré.

Après quoi, on dissout le précipité par quelques gouttes d'eau régale et on recueille dans un petit tube à essai avec les eaux de lavage. Cette solution acide est transvasée dans une capsule et évaporée à sec au bain-marie électrique (éviter la fixation possible du cuivre entraîné par un bec Bunsen).

Le résidu de chlorure de cuivre est finalement dissous dans quelques gouttes d'eau et le cuivre dosé colorimétriquement.

a) A L'ÉTAT D'EAU CÉLESTE. — Le dosage par cette méthode ne sera possible que si le cuivre est en quantité suffisante ; pratiquement, il n'a pu être utilisé que pour les analyses de *Gryphea angulata* et *Ostrea edulis*.

Il suffit d'ajouter un excès d'ammoniaque à la solution de chlorure de cuivre et de verser dans une fiole jaugée, en filtrant si c'est nécessaire. Après avoir amené la solution au volume convenable, on mesure son intensité de coloration à l'électrophotomètre.

b) A L'ÉTAT DE FERROCYANURE DE CUIVRE. — Ce sera le cas le plus fréquent, mais aussi le plus délicat.

Il est, en effet, pratiquement impossible d'obtenir, à partir du chlorure de cuivre isolé par la technique précédemment décrite, un hydrosol de ferrocyanure de cuivre stable et limpide, tel que l'exige la méthode colorimétrique de dosage. Presque toujours, les solutions sont opalescentes et le ferrocyanure de cuivre est rapidement floclulé, produisant un trouble rendant impossible toute détermination colorimétrique.

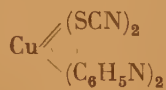
Il semble que la cause de cette perturbation doive être attribuée à la présence de métaux existant dans la matière vivante et précipités en même temps que le cuivre par l'hydrogène sulfuré en milieu chlorhydrique. De fait, des traces d'étain ont pu être caractérisées dans le précipité de sulfure de cuivre, par analyse spectrale et par voie chimique. L'hydroxyde d'étain trivalent est, en effet, faiblement soluble dans l'ammoniaque ; il est probable que la minéralisation des organes par voie sulfo-nitroperchlorique amène l'étain à ce degré d'oxydation et que la faible quantité présente passe alors intégralement en solution ammoniacale, d'où elle est ensuite précipitée lors de la formation du zincate.

Il est possible qu'outre l'étain, on se trouve en présence de traces d'autres éléments, tels que l'arsenic, ou même le platine pouvant provenir de la chaux utilisée qui est préparée par calcination de nitrate de calcium dans une capsule de platine.

Quoi qu'il en soit, il est nécessaire d'isoler le cuivre de ces métaux gênants pour rendre possible son dosage colorimétrique.

Séparation du cuivre par la technique de Spacu (135)

Si l'on ajoute à la solution du sel de cuivre quelques gouttes de solution de sulfocyanure d'ammonium et de la pyridine, il se forme un complexe verdâtre de formule



qui est peu soluble dans l'eau et précipite.

GOLSE (68) a étudié cette technique et montré que si l'on séparait ce complexe par filtration, on n'obtenait jamais la totalité du cuivre en raison de la solubilité — faible, mais non pas négligeable — du composé. Il propose, pour avoir

des résultats exacts, de multiplier le chiffre de cuivre obtenu par pesée du complexe, par un certain facteur déduit de sa solubilité dans l'eau. Mais un tel procédé oblige à définir très exactement toutes les conditions de précipitation (volume du liquide, température, etc.) et complique beaucoup le dosage.

Il est beaucoup plus simple, pour isoler la totalité du cuivre, de mettre à profit la solubilité du complexe dans le chloroforme. Certes, un coefficient de partage intervient et le précipité ne passe pas intégralement dans le chloroforme lors du premier épuisement, mais trois épuisements suffisent, dans la majorité des cas, pour enlever à la phase aqueuse la totalité du cuivre.

Pratiquement, on opérera de la manière suivante : la solution contenant le cuivre sera versée dans une petite ampoule à décantation ; on y ajoutera 1 cc. de solution aqueuse à 10 % de sulfocyanure d'ammonium et quelques gouttes de pyridine. Le liquide sera alors épuisé par trois fois 2 cc. de chloroforme (le chloroforme du troisième épuisement doit être totalement incolore). Les liqueurs chloroformiques, recueillies dans une petite capsule seront évaporées lentement, à température ordinaire (éviter de chauffer au bain-marie, le chloroforme « grim pant » sur les bords de la capsule) ; le résidu sec est coloré en vert plus ou moins intense ; on détruit la combinaison en y ajoutant quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré. Après évaporation, à sec, on reprend par l'eau et on amène la liqueur au volume convenable pour faire la lecture colorimétrique, après addition de ferrocyanure de K. La solution de ferrocyanure de cuivre obtenue ainsi est toujours parfaitement limpide.

La valeur de cette technique est justifiée par le tableau suivant qui donne les résultats de plusieurs dosages de cuivre effectués par la méthode au ferrocyanure, après isolement à l'état de complexe de Spacu, en partant de quantités connues de métal.

Cuivre introduit en mgr.	Cuivre retrouvé en mgr.	Erreur relative %
0,200	0,200	0
0,198	0,199	+ 0,5
0,181	0,180	— 0,55
0,175	0,178	+ 1,7
0,170	0,170	0
0,165	0,164	— 0,61
0,150	0,150	0
0,143	0,145	+ 1,4
0,110	0,115	+ 4,5
0,100	0,103	+ 3
0,070	0,070	0
0,065	0,067	+ 3,1
0,060	0,061	+ 1,65
0,050	0,048	— 4
0,030	0,029	— 3,3
0,025	0,024	— 4

Pour tous ces dosages, l'erreur relative reste toujours dans les limites de l'erreur systématique de la technique.

Il est à noter que la coloration verte de la solution chloroformique du composé complexe du cuivre est susceptible d'être directement utilisée pour le dosage colorimétrique ; son intensité de coloration est du même ordre de grandeur que celle du ferrocyanure de cuivre. De fait, elle a été utilisée par BIAZZO (31) et, ultérieurement, par plusieurs auteurs.

La coloration du ferrocyanure de cuivre a l'avantage de permettre un meilleur contrôle de l'identité du métal dosé, par comparaison des chiffres obtenus dans deux couleurs à l'électrophotomètre.

5. — DOSAGE DU ZINC

La liqueur chlorhydrique provenant de la filtration du sulfure de cuivre est évaporée à sec et reprise par l'eau chaude. On se place alors en milieu citrique, par addition de 1 cc. de solution tampon renfermant, pour 100 cc., 10 grammes d'acide citrique et 20 grammes de citrate d'ammonium.

Le sulfure de zinc est précipité en faisant passer, pendant un temps assez long, un courant d'hydrogène sulfuré. Le précipité obtenu est parfaitement blanc, le nickel et le cobalt ne précipitant pas dans ces conditions, ainsi que l'ont montré Gabriel BERTRAND et MOKRAGNATZ ; j'ai d'ailleurs, à plusieurs reprises, recherché la présence possible de nickel et de cobalt dans le précipité de sulfure de zinc sans jamais en trouver la moindre trace.

Après repos de vingt-quatre heures, le sulfure de zinc est filtré sur un filtre en verre poreux d'Iéna, en évitant avec soin le contact prolongé avec l'air ; on lave le précipité avec quelques centimètres cubes d'eau bouillie acidulée par l'acide citrique et saturée d'hydrogène sulfuré.

Le sulfure est alors dissous à chaud, sur le filtre avec quelques centimètres cubes d'acide sulfurique à 10 %, puis le liquide est évaporé au bain-marie d'abord, puis doucement, en évitant les projections, sur une veilleuse de bec Bunsen, dans une capsule de platine ou un creuset tarés. On chauffe jusqu'à cessation des vapeurs blanches d' SO_3 , puis on laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse le sulfate de zinc anhydre obtenu.

Le poids du sulfate, multiplié par 0,404, donne la teneur en zinc de la prise d'essai.

6. — SÉPARATION DU NICKEL ET DU COBALT

Parvenus à ce stade, Gabriel BERTRAND et MOKRAGNATZ (19) précipitent le nickel et le cobalt en alcalinisant la liqueur citrique par l'ammoniaque ; les deux métaux sont insolubilisés à l'état de sulfures. Mais dans le cas présent, les quantités de nickel et de cobalt seront beaucoup trop faibles, en général, pour qu'il soit possible d'opérer ainsi sans risque de pertes importantes.

Il semble préférable d'opérer de la manière suivante : la

solution citrique est évaporée à sec, puis on détruit l'acide organique en chauffant avec un peu d'acide sulfurique et d'acide perchlorique, avec précaution, pour éviter les projections. On chauffe ainsi jusqu'au départ total des acides et obtention d'un résidu sec, parfaitement incolore. Ce résidu, délayé dans un peu d'eau bouillante, est repris par l'ammoniaque concentrée. Par filtration, on obtient une liqueur contenant la totalité du nickel et du cobalt ; la plus grande partie du calcium présent est restée insolubilisée à l'état de sulfate.

Ce sulfate de calcium, cristallin, n'a aucune tendance à retenir les sulfates de nickel et le cobalt qui l'accompagnent et deux ou trois lavages à l'ammoniaque entraînent la totalité de ces deux métaux ; par ce traitement, les dernières traces de fer et de manganèse, s'il en restait dans la liqueur, se trouveraient éliminées.

Un point à vérifier est celui de savoir si la destruction de l'acide citrique par le mélange d'acides sulfurique et perchlorique et l'évaporation d'acide sulfurique qui suit cette destruction ne s'accompagnent pas d'une perte de nickel ou de cobalt par entraînement mécanique ou volatilité.

Les quelques dosages suivants montrent qu'il n'en est rien (la question sera d'ailleurs étudiée avec plus de détails lors de l'examen des méthodes de destruction de la matière vivante).

Nickel ajouté en γ	Nickel retrouvé en γ	Erreur relative %
15	14,8	— 1,33
8	7,95	— 0,62
1,6	1,65	+ 3,1
10	9,85	— 1,5
3	2,9	— 3,3

A la liqueur citrique, additionnée de chlorure de calcium

et de quantités connues de nickel et de cobalt, on ajoute le mélange d'acides sulfurique et perchlorique. Le tout est chauffé dans une capsule jusqu'à obtention d'un résidu incolore.

La liqueur ammoniacale contenant le nickel et le cobalt est chauffée au bain-marie et additionnée de quelques gouttes de solution alcoolique à 1 % de diméthylglyoxime ; on évapore presque à sec pour chasser totalement l'alcool et l'ammoniaque (la solubilité du précipité de nickel diméthylglyoxime dans l'eau chaude contenant de l'alcool et de l'ammoniaque est, en effet, loin d'être négligeable et a été étudiée par P. NUKA (118)).

On obtient finalement un précipité rouge, renfermant tout le nickel à l'état de combinaison avec la diméthylglyoxime (140) et quelques gouttes d'une liqueur plus ou moins colorée en brun et renfermant tout le cobalt à l'état de complexe soluble avec la diméthylglyoxime.

On délaye avec un peu d'eau saturée de diméthylglyoxime et on filtre sur un petit filtre d'amiante, analogue à celui ayant servi au dosage du cuivre : le nickel reste sur filtre, le cobalt passe avec les eaux de lavage du précipité.

Cette technique permet de séparer, sans pertes appréciables des quantités de nickel de l'ordre de 1 γ.

7. — DOSAGE DU NICKEL

On verse sur le filtre quelques gouttes d'eau de brome ; le complexe de nickel-diméthylglyoxime est immédiatement détruit et devient soluble dans l'eau ; on recueille l'eau de brome et les eaux de lavage du filtre dans une fiole jaugée de volume convenable (d'après la quantité approximative de nickel présent, déduite de l'importance du précipité de nickel-diméthylglyoxime). On ajoute au liquide la quantité nécessaire d'ammoniaque à 10 % pour la décoloration totale

de l'eau de brome, puis quelques gouttes de solution alcoolique de diméthylglyoxime à 1 %.

La teinte rose orangée caractéristique du nickel se développe immédiatement et est mesurée à l'électrophotomètre.

8. — DOSAGE DU COBALT

Les eaux de lavage du précipité de nickel qui contiennent tout le cobalt à l'état de combinaison avec la diméthylglyoxime sont évaporées à sec ; pour détruire cette combinaison, on la calcine dans une petite capsule avec une goutte d'acide sulfurique.

Le résidu, repris par l'eau chaude, est filtré dans une ampoule à décantation et on effectue la réaction à l' α -nitroso- β -naphthol, selon la technique déjà décrite.

CONTROLE DE LA MÉTHODE

La technique décrite a été exécutée sur des solutions renfermant les quatre métaux à des concentrations voisines de celles auxquelles on pourrait les rencontrer dans des prises d'essai d'une cinquantaine de grammes de matière fraîche.

	Métaux dans la solution en mgr.	Métaux retrouvés d'après la technique au zincate en mgr.
1) Cuivre	0,200	0,201
Zinc	10,0	9,94
Nickel	0,0200	0,0198
Cobalt	0,0200	0,0200
2) Cuivre	0,150	0,145
Zinc	25,0	25,3
Nickel	0,0080	0,0085
Cobalt	0,0050	0,0048
3) Cuivre	0,075	0,078
Zinc	4,0	3,84
Nickel	0,0040	0,0039
Cobalt	0,0015	0,0012

REMARQUE. — La technique décrite peut se simplifier beaucoup, si l'on n'a en vue que le dosage de tel ou tel métal.

C'est ainsi que le cuivre pourra être dosé, sans passer par le zincate de calcium, sur le précipité de sulfures obtenu à partir de la solution chlorydrique des cendres.

Pour le nickel, il sera toujours préférable de passer par l'intermédiaire du zincate de calcium ; mais, après élimination du cuivre à l'état de sulfure, à partir de la solution chlorydrique de ce zincate et évaporation à sec, on pourra doser le nickel en présence de zinc et de cobalt. Il suffira, lors de l'obtention de la réaction colorée du nickel, d'ajouter assez d'ammoniaque pour redissoudre totalement l'hydroxyde de zinc qui n'exerce aucune influence sur l'intensité de coloration du complexe ; les traces très faibles de cobalt dans le milieu ne gêneront pas davantage la mesure colorimétrique.

CHAPITRE IV

DESTRUCTION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE

Quelle que soit la méthode choisie pour le dosage des éléments métalliques dans la matière vivante, ce dosage ne pourra être fait avec exactitude que s'il est précédé d'une destruction convenable de la matière organique.

Deux techniques principales peuvent être utilisées dans ce but :

1^o la destruction par voie sèche, qui consiste à brûler la matière organique jusqu'à obtention d'un résidu minéral parfaitement blanc. Cette obtention des cendres a fait l'objet d'études précises (25) et donne d'excellents résultats ;

2^o la destruction par voie humide, consistant à détruire la matière organique, en milieu liquide, par action de substance oxydante. De nombreuses techniques ont été décrites et les deux procédés qui sont le plus couramment employés utilisent l'action oxydante de l'acide nitrique ou de l'acide perchlorique (destruction sulfonitrique, nitroperchlorique, sulfonitroperchlorique).

Il est intéressant de comparer ces diverses techniques du point de vue de leur commodité et de l'exactitude des résultats qu'elles fournissent. Parmi les méthodes de destruction par voie humide, la méthode sulfonitro-perchlorique, dont l'usage s'est répandu en France à la suite des travaux de KAHANE (83), présente sur les autres techniques des avantages sérieux. Outre sa rapidité, elle permet de réaliser la destruction totale des tissus avec des quantités réduites de

réactifs, ce qui est important puisque ces réactifs doivent subir des purifications préalables.

OBTENTION DES CENDRES

La substance à calciner, séchée à 105°, puis pulvérisée, est étendue en couches minces sur des capsules à fond plat et à bords peu élevés.

Durant toute cette opération, il importe d'éviter la présence d'une atmosphère réductrice qui pourrait provoquer des pertes en métaux, soit à cause de la réduction à l'état métallique et entraînement par volatilité (pour Zn principalement), soit par formation de métaux-carbonyle.

On charbonne donc à très basse température (inférieure au rouge naissant) ; le charbon obtenu est lessivé à plusieurs reprises à l'eau bouillante, puis calciné jusqu'à obtention de cendres blanches (au rouge à peine naissant). La partie soluble est évaporée à sec et ajoutée au charbon, lors de la calcination finale.

Les cendres sont ensuite solubilisées par l'acide chlorhydrique concentré et on évapore à sec pour éliminer la silice par chauffage un peu au-dessus de 100°.

Cette technique est celle qui a été mise au point par G. BERTRAND et utilisée par plusieurs de ses collaborateurs ; pour les végétaux, elle est rapide et donne d'excellents résultats ; elle est un peu plus pénible pour les animaux. La masse boursoufle, s'agglomère et l'opération est assez longue.

DESTRUCTION SULFO-NITRO-PERCHLORIQUE

La matière sèche broyée est introduite dans un matras Kjeldahl de grande capacité (500 cc. pour les prises d'essai de 4 à 10 grammes). On ajoute de l'acide sulfurique concentré

(1 cc. environ par gramme de matière sèche), on chauffe jusqu'à brunissement, puis on laisse tomber goutte à goutte de 15 à 25 cm³ d'acide nitrique fumant. L'attaque nitrique s'amorce d'elle-même et se poursuit brutalement. Il faut ajouter l'acide lentement et aspirer à la trompe les vapeurs nitriques qui se dégagent (cf. p. 70 le schéma de l'appareil utilisé).

Lorsque l'attaque nitrique est terminée, on a un liquide homogène, jaune citrin. On chauffe alors pour chasser l'excès d' NO_3H : le liquide se décolore, puis brunit et devient visqueux (on a intérêt à mettre dans le matras un fragment d'agitateur pour régulariser l'ébullition).

On laisse alors tomber goutte à goutte un mélange nitroperchlorique (*) ; chaque goutte détermine l'apparition de fumées blanches (destruction de ClO_4H) ; la matière organique se décolore rapidement et on poursuit l'addition d'acide perchlorique jusqu'à décoloration totale.

La destruction demande de 30 minutes à une heure.

Finalement, on obtient un liquide incolore (parfois jaune clair, à chaud, si l'organe est riche en fer). Toute la matière minérale est rassemblée dans les quelques centimètres cubes d' SO_4H_2 ajoutés au début ; la silice est insolubilisée ; le calcium est précipité à l'état de SO_4Ca .

Pour la suite de l'analyse, il est nécessaire de chasser l'excès d'acide sulfurique, d'où l'intérêt de la méthode sulfonitroperchlorique qui permet de n'en introduire qu'une quantité minime.

La liqueur acide et les eaux de lavage du matras sont versées dans une capsule de porcelaine et évaporées au bain de sable lentement, pour éviter les soubresauts et les projections, jusqu'à siccité. Le résidu sec est alors repris par l'eau bouillante pour désagréger la masse solidifiée et le

(*) Mélange :

Acide perchlorique.....	D = 1,61	2 volumes
Acide nitrique.....	D = 1,39	1 volume

mélange est additionné d'un peu d'acide chlorhydrique pour dissoudre les métaux dont une partie peut se trouver à l'état de phosphates insolubles dans l'eau.

Sur la liqueur obtenue on poursuit l'analyse suivant la technique au zincate déjà décrite.

ESSAI COMPARATIF DES DEUX MÉTHODES DE DESTRUCTION

Les deux méthodes de destruction par voie sèche et par voie humide (sulfo-nitro-perchlorique) ont été expérimentées comparativement, à partir d'échantillons homogénéisés par pulvérisation, puis divisés en deux parties. Le tableau suivant donne les résultats de plusieurs de ces analyses.

De l'examen du tableau (p. 84) il apparaît que les chiffres obtenus pour le zinc, le nickel et le cobalt sont concordants, aux erreurs d'expériences près et qui sont imputables tant aux différences des deux techniques qu'à la difficulté d'obtenir, même après pulvérisation, deux prises d'essai rigoureusement identiques.

Mais il n'en va pas de même pour le cuivre ; la méthode par voie sèche provoque des pertes importantes et beaucoup trop élevées pour qu'on puisse invoquer des erreurs d'expérience. De plus, l'importance de ces pertes est fonction de la température à laquelle a été opérée la calcination : lors de deux essais, durant lesquels la température du four avait été portée au rouge, le cuivre a entièrement disparu.

Ces constatations sont à rapprocher de différents faits, signalés par Gabriel BERTRAND (10), relatifs aux pertes en cuivre par calcination et à des transports à distance du métal lors de la combustion et paraissent justiciables de la formation d'un composé volatil de cuivre-carbonyle, selon l'hypothèse formulée par cet auteur. Les cendres des tissus animaux étant difficiles à obtenir sans provoquer un boursoufle-

ment de la masse et la formation d'un charbon compact, il existe vraisemblablement, au cours de la combustion et en certains points de cette masse, une atmosphère réductrice favorisant la formation de cuivre carbonyle.

Comparaison des résultats obtenus à partir des cendres et après destruction sulfo-nitro-perchlorique

		Métal en milligrammes		Divergence des deux dosages %
		Destruction sulfonitro- perchlorique	Destruction par les cendres	
<i>Tapes decussatus L.</i> 1 an	Cu	0,081	0,062	23,5
	Zn	1,13	1,05	7,1
	Ni	0,0108	0,0115	6,5
	Co	0,0022	0,0023	4,5
<i>Tapes decussatus L.</i> 2 ans	Cu	0,074	—	—
	Zn	1,24	1,16	6,45
	Ni	0,0174	0,0166	4,6
	Co	0,0035	0,0031	11
<i>Mytilus edule L.</i> 1 an	Cu	0,082	0,045	45
	Zn	0,65	0,69	6,15
	Ni	0,0075	0,0071	5,35
	Co	0,0043	0,0039	9,3
<i>Mytilus edule L.</i> 1 an 1/2	Cu	0,086	0,065	24,5
	Zn	2,00	1,94	3
	Ni	0,0058	0,0052	10,5
	Co	0,0042	0,0038	9,5
<i>Mytilus edule L.</i> 2 ans	Cu	0,090	—	—
	Zn	3,07	2,98	3
	Ni	0,0088	0,0083	5,7
	Co	0,0053	0,0048	9,5
<i>Gryphea angulata Lam.</i> (masse viscérale)	Cu	1,39	0,42	69,5
	Zn	7,51	7,19	4,2
	Ni	0,0050	0,0053	6
	Co	0,0038	0,0034	10,5

L'obtention des cendres des tissus animaux en vue du dosage du cuivre est donc une opération délicate qui doit être

conduite avec la plus grande prudence et nécessite beaucoup de temps lorsqu'on a à détruire une certaine quantité de matière. Dans ce cas, il semble préférable de s'adresser à une méthode de destruction par voie humide qui évitera la formation de métaux-carbonyle en retenant les métaux à l'état de sulfates. Mais il ne s'ensuit pas que ces techniques mettent à l'abri de toutes pertes de métaux ; GUILLEMET (74), en particulier, signale des pertes de cuivre lors de la destruction nitroperchlorique. Il importe donc, avant tout, d'examiner si, lors de la destruction elle-même ou lors de l'évaporation de l'excès d'acide sulfurique qui suit cette destruction, on n'a pas à constater d'entraînement sensible des métaux recherchés.

ÉTUDE DE LA DESTRUCTION

Outre les remarques de GUILLEMET (74), KAHANE signale des pertes appréciables pour certains éléments, tels que manganèse et chrome (84).

Il semble que les causes de cet entraînement puissent se rattacher aux trois catégories suivantes :

a) Volatilité des sulfates métalliques formés à la température maximum atteinte au cours de la destruction. Cette température est au moins égale à celle d'ébullition de l'acide sulfurique ;

b) Entraînement mécanique à l'état de petites vésicules par les vapeurs abondantes qui se dégagent lors de la destruction ;

c) Formation possible, lors de la destruction de la substance organique, de composés organo-métalliques volatils.

Un certain nombre d'essais ont été effectués tant au cours de la destruction qu'au cours de l'évaporation à sec du résidu sulfurique.

RECHERCHE DES PERTES PENDANT LA DESTRUCTION.

Les essais furent conduits de deux manières opposées :

1^o En additionnant une substance organique de quantités connues de métaux et en dosant les métaux restants après destruction ;

2^o En recherchant les métaux éventuellement entraînés pendant la destruction d'un échantillon quelconque de substance animale dans le liquide de condensation des vapeurs.

PREMIÈRE SÉRIE D'ESSAIS

Il est pratique d'utiliser, pour ces essais, une substance organique dont la prise d'essai utilisée ne renferme aucune trace des métaux essayés ; on évite ainsi de déduire du chiffre total obtenu la quantité de métal apportée par la substance et, partant, les erreurs dues à son hétérogénéité possible.

La substance organique choisie pour ces essais fut l'acide citrique, recristallisé et pulvérisé, dont 5 grammes (quantité utilisée pour chaque essai) ne renfermaient aucune trace décelable des métaux recherchés (*). La destruction était conduite sans précautions spéciales, voire même assez brutalement, pour provoquer un abondant dégagement de vapeurs.

Pour simplifier les dosages, l'étude a été faite séparément pour chaque métal qui fut dosé directement dans le résidu d'évaporation de l'acide sulfurique.

(*) Quelques essais furent également faits à partir de fibrine (fibrine normalisée Byla) ; les faibles traces de métaux que contenaient les prises d'essai furent déduites du chiffre total obtenu.

Entraînement du fer

Le résidu d'évaporation est repris par l'acide sulfurique normal et le dosage colorimétrique par la technique au cupferron, effectué sur une portion aliquote du liquide.

Fer introduit en mgr.	Fer retrouvé en mgr.	Erreur relative %
5,00	5,02	+ 0,4
2,00	2,06	+ 3
1,00	0,98	— 2
0,50	0,51	+ 3

Entraînement du cuivre

Le résidu d'évaporation est repris par l'eau chaude, puis par l'ammoniaque pour dissoudre la totalité du cuivre. Après évaporation de la solution ammoniacale, puis transformation du cuivre en chlorure, on dose le métal par colorimétrie au ferrocyanure.

Cuivre introduit en mgr.	Cuivre retrouvé en mgr.	Erreur relative %
0,150	0,152	+ 1,5
0,100	0,103	+ 3
0,075	0,074	— 1,25
0,050	0,050	0
0,030	0,031	+ 3,3
0,025	0,026	+ 4

Entraînement du zinc

Le résidu est repris par l'eau et le zinc précipité à l'état de sulfure par l'hydrogène sulfuré en milieu citrique. Le métal

est ensuite dosé par pesée du sulfate anhydre selon la technique de Gabriel BERTRAND et JAVILLIER.

Zinc introduit en mgr.	Zinc retrouvé en mgr.	Erreur relative %
42	41,6	— 1
20	20,2	+ 1
10	9,8	— 2
4,4	4,5	+ 2,5

Entraînement du nickel

Le résidu d'évaporation est traité, dans la capsule même, par quelques gouttes d'eau ammoniacale additionnée d'une trace de solution alcoolique à 1 % de diméthylglyoxime ; le mélange est promené à l'aide d'un agitateur sur toute la paroi de la capsule, pour rendre visible la moindre trace de nickel. Après évaporation à sec, au bain-marie, le précipité rouge, est dissous dans quelques gouttes d'eau de brome ; on effectue alors le dosage colorimétrique.

Nickel introduit en millièmes de mgr.	Nickel retrouvé en millièmes de mgr.	Erreur relative %
50	50	0
48	48,8	+ 1,64
32	32,5	+ 1,56
24	24,4	+ 1,66
16	15,5	— 3,1
8	8,1	+ 1,25
3,2	3	— 6,25
1,6	1,5	+ 6,25

Entraînement du cobalt

Le sulfate de cobalt est dissous par lavage très soigneux de la capsule à l'eau bouillante et dosé à l'aide du nitroso- β -naphtol.

Cobalt introduit en millièmes de mgr.	Cobalt retrouvé en millièmes de mgr.	Erreur relative %
10	9,85	— 1,5
5	5,1	+ 2
2	2,05	+ 2,5

Conclusion

Pour la totalité des essais, il n'a pas été constaté de pertes sensibles des métaux recherchés, l'erreur relative constatée lors du dosage restant toujours dans les limites de l'erreur systématique.

DEUXIÈME SÉRIE D'ESSAIS

Il s'agit de rechercher dans le liquide de condensation, les traces de métaux susceptibles d'avoir été entraînés avec les vapeurs lors de la destruction.

L'appareil utilisé pour cette étude est semblable — à quelques détails près — à celui décrit par E. KAHANE (83). Il a été utilisé, par la suite, pour effectuer la totalité des destructions.

L'acide nitrique et l'acide perchlorique sont introduits à l'aide de l'ampoule. La collerette a pour but d'éviter les souillures accidentelles par les poussières, lors de la destruction. Les vapeurs sont condensées dans le réfrigérant à chicane et recueillies dans les fioles et après barbotage dans l'eau bidistillée (Voir fig. 4 page 90).

Plusieurs essais ont été réalisés :

1^o 5 grammes d'acide citrique, additionnés de quantités

(*) Ce même appareil a été utilisé par G. Brooks pour réaliser la destruction sulfo-nitro perchlorique dans le vide (*C. R. Acad. Sciences*, 202, p. 2016, 1936.

connues de fer, cuivre, zinc, nickel et cobalt, ont été détruits par la méthode sulfo-nitro-perchlorique, les barboteurs contenant assez d'eau bidistillée pour condenser la presque to-

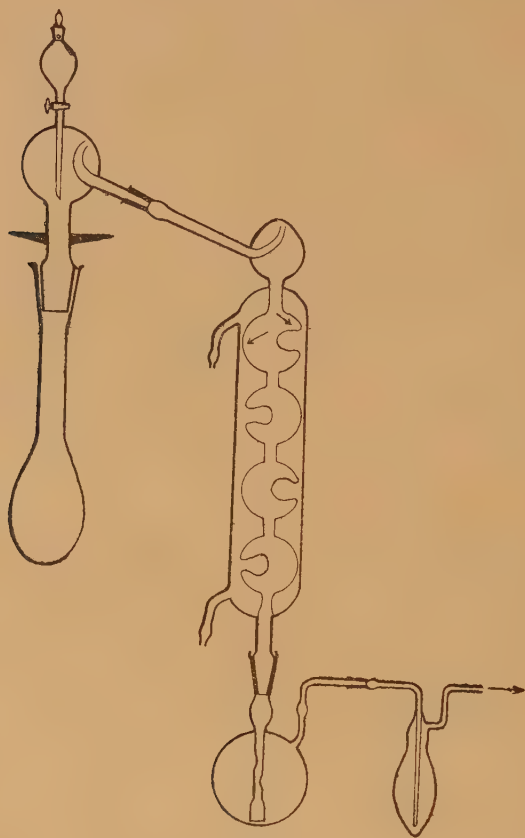


Fig. 4

talité des vapeurs. Après la destruction, l'eau de ces barboteurs a été évaporée à sec et analysée.

	Métaux ajoutés à l'acide citrique, en mgr.	Métaux retrouvés dans les barboteurs
Fer.....	20	non décelé
Cu	2	»
Zn	200	»
Ni	0,064	»
Co	0,050	»

2^o Destruction de 10 grammes de *Mytilus edule* (matière sèche), additionnés de quantités connues de métaux.

	Métal introduit en mgr.	Métal retrouvé dans les barboteurs
Fe	10	non décelé
Cu	2	»
Zn	20	»
Ni	0,064	»

3^o En conséquence, l'entraînement — s'il a lieu — est très faible. Pour avoir une idée de son ordre de grandeur, 10 grammes de matière sèche (muscle de *Pecten maxipus*) ont été détruits, après addition de fortes quantités de métaux.

	Métal introduit en mgr.	Métal retrouvé dans les barboteurs en mgr.
Fe	500	0,056
Cu	15	0,042
Zn	1000	2,2
Ni	5	0,0085

L'entraînement constaté est, de fait, très inférieur à l'erreur

systématique des dosages et il est, en conséquence, inutile d'en pousser plus loin l'étude, d'un point de vue pratique.

ENTRAÎNEMENT PENDANT L'ÉVAPORATION DE L'ACIDE SULFURIQUE

Cette évaporation constitue la seconde phase de la destruction de la matière organique : à première vue, il ne semble pas qu'elle s'accompagne de pertes notables de métaux, tous les essais précédents ayant, en effet, comporté une telle évaporation.

Les quelques essais suivants ont été faits sur une quantité plus forte d'acide sulfurique (vingt centimètres cubes) qui fut additionnée de métaux et évaporée assez vivement au bain de sable. Le métal était dosé dans le résidu d'évaporation.

	Métal ajouté en mgr.	Métal retrouvé en mgr.
Cuivre	0,175	0,172
	0,150	0,153
	0,125	0,128
	0,080	0,082
	0,060	0,059
	0,040	0,039
	0,025	0,026
	0,0320	0,0320
Nickel	0,0260	0,0259
	0,0145	0,0144
	0,0065	0,00645
	0,0052	0,00525
	0,0032	0,0030
	0,0016	0,00155

Comme prévu, l'évaporation n'a provoqué aucune perte sensible pour les deux métaux étudiés.

FIXATION DU CUIVRE PAR LA FLAMME
DU BEC BUNSEN PENDANT CETTE ÉVAPORATION

Lors de l'évaporation de l'acide sulfurique, il est possible que des particules de cuivre, entraînées par la flamme du bec Bunsen, se fixent sur cet acide.

Pour vérifier ce point, on a évaporé, lentement, 50 cc. d'acide sulfurique, au bain de sable ; auprès de la capsule fut placé un bec Bunsen brûlant en dedans. Après évaporation totale de l'acide, la recherche du cuivre, sur le résidu sec de la capsule, a été négative (au-dessous de la limite de sensibilité de la réaction de Spacu).

CHAPITRE V

LES RÉACTIFS ET LEUR PURIFICATION. LE MATÉRIEL.

1. — PURIFICATION DES RÉACTIFS

Cette purification constitue un point essentiel, du fait de la très petite quantité de métal que la technique décrite permet de déceler ; dans tous les réactifs courants, même ceux dits « purs pour analyse », on peut rencontrer des quantités dosables des éléments cherchés.

Une purification spéciale s'impose donc pour chaque réactif, qui ne sera utilisable que lorsque l'analyse d'une quantité nettement supérieure à celle nécessaire pour un dosage courant ne contiendra aucune trace de métal décelable par la méthode utilisée pour son dosage.

L'EAU. — L'eau distillée, obtenue dans des appareils de cuivre peut renfermer des quantités appréciables de ce métal ; dans l'eau du laboratoire, j'ai trouvé jusqu'à 3 mgr. 9 de cuivre par litre.

Cette eau, redistillée dans des appareils entièrement construits en verre Pyrex et sous pression réduite, ne contient plus que des traces très faibles de cuivre ; une deuxième distillation sur carbonate enlève les dernières traces et on a finalement un produit renfermant :

Fer	moins de 0 mgr. 002	par litre
Cuivre	» » 0 mgr. 005	» »
Zinc	» » 0 mgr. 05	» »
Nickel	» » 0 mgr. 0002	» »
Cobalt	» » 0 mgr. 0002	» »

La quantité totale d'eau nécessaire pour une analyse, qui est d'environ 200 cc., n'introduira, par suite, aucune erreur appréciable.

LES ACIDES. — L'acide nitrique fumant a été purifié par distillation dans un appareil en Pyrex ; l'acide sulfurique, redistillé sous pression réduite, en éliminant le dernier tiers restant dans la cornue ; l'acide perchlorique redistillé sous pression réduite, en présence de 1 /4 d'acide sulfurique (Voir *Kahane* (83)). L'acide chlorhydrique a été obtenu à partir du produit pur du commerce dans un appareil de Woolf ; on obtient une solution $D = 1,26$ (*).

Ces acides furent essayés dans les mêmes conditions que l'eau bidistillée, c'est-à-dire, sur des quantités cinq fois supérieures aux quantités moyennes nécessaires, et la recherche des métaux fut négative.

L'AMMONIAQUE. — Obtenue à partir de la solution pure commerciale, par distillation dans un appareil de Woolf 100 cc. de solution concentrée ainsi préparée ont toujours été trouvés exempts d'impuretés métalliques.

LA CHAUX. — Préparée par calcination du nitrate de calcium pur, en deux temps, au four électrique, dans une capsule de platine. Ce nitrate est lui-même obtenu à partir du produit commercial, en précipitant les impuretés qu'il renferme par ébullition avec un excès de chaux.

La préparation de ce réactif est très délicate et demande beaucoup de temps et de soins ; on ne saurait trop insister sur son importance, car seule une chaux rigoureusement pure et exempte de carbonate permettra d'effectuer des analyses correctes.

(*) On trouvera dans le mémoire de G. BERTRAND et MOKRAGNATZ (19) des détails sur la préparation spéciale de l'acide chlorhydrique.

ACIDE CITRIQUE. — CITRATE D'AMMONIUM. —
Purifiés par plusieurs recristallisations.

ACIDE SULFURIQUE. — Préparé dans un appareil de Kipp. Le gaz est lavé par barbotage et les vésicules de fer entraînées (provenant du sulfure de fer) sont retenues dans un long tube de verre de deux centimètres de diamètre, rempli de coton cardé (*).

2. — LE MATÉRIEL UTILISÉ

Il est constitué uniquement de verre Pyrex et de porcelaine, qui renferment des quantités appréciables des métaux recherchés. Plusieurs essais de ce matériel avec les divers réactifs utilisés au cours de l'analyse ont montré qu'il ne cédait pas, dans les diverses conditions opératoires de traces appréciables de ces métaux (**).

(*) C'est Gabriel BERTRAND, lors de ses recherches sur la présence de l'arsenic normal dans des tissus animaux, qui a attiré l'attention sur cet entraînement vésiculaire par l'hydrogène sulfuré et montre la nécessité de filtrer le gaz.

(**) Une telle recherche n'était pas superflue. En effet, COUPPIN (*Comptes-Rendus*, 136, p. 392, 1903), reprenant les expériences de RAULIN, était arrivé à cette conclusion que le zinc était nuisible à l'*Aspergillus*, dont la croissance était tout à fait normale sur milieu absolument privé de zinc. Gabriel BERTRAND, analysant ce travail (*Bull. Institut Pasteur*, 1, p. 68, 1903) signale que le verre contient du zinc et qu'à la température de la stérilisation les milieux de culture pourraient dissoudre, à partir de ce verre, une petite quantité de zinc susceptible de fausser totalement les expériences.

La démonstration expérimentale de ce fait a été donnée par Javillier (79 bis).

DEUXIÈME PARTIE

RÉSULTATS ANALYTIQUES

Les métaux, dont les techniques d'isolement et de dosage viennent d'être décrites, ont été dosés dans les principales espèces comestibles de mollusques lamellibranches marins.

Pour en faire une étude aussi précise que possible, je me suis appliqué à ne prendre que des mollusques de provenance bien déterminée, élevés ou récoltés dans les meilleures conditions. Tous les échantillons analysés proviennent des côtes de la Charente-Inférieure, notamment de la région comprise entre l'embouchure de la Gironde et celle de la Seudre, et dénommée : presqu'île d'Arvert. Ce sont des espèces lamellibranches très répandues et faisant, pour la plupart, l'objet d'élevages importants. En raison de sa très grande abondance dans la région, j'ai analysé également une espèce de mollusques gastéropodes : *Patella vulgata*.

L'origine exacte et la date du prélèvement ont été notées, ainsi que la taille moyenne des individus du lot.

La quantité de matière fraîche nécessaire au dosage du nickel et du cobalt étant de l'ordre de cinquante grammes, il a fallu procéder, sur des organismes souvent de taille réduite, à des dissections exigeant un temps assez long et veiller à éviter, lors de ces manipulations, toute cause de souillure accidentelle.

L'eau de mer exerçant une action corrosive notable sur les instruments métalliques qui auraient pu être utilisés pour la séparation des organes, il a fallu réduire au minimum l'usage de ces instruments.

Pour ouvrir les mollusques et les débarrasser de leur coquille, j'ai utilisé un couteau en acier inoxydable (*) ;

(*) Il a été vérifié au préalable que, par séjour prolongé dans l'eau de mer, cet instrument ne cédait aucune trace des éléments à doser.

toutes les dissections ont été ensuite pratiquées sur une plaque de verre et en utilisant exclusivement des instruments de verre.

Avant l'ouverture des mollusques, la coquille était lavée à l'eau bidistillée et brossée pour la débarrasser de la vase.

Les organes, séparés par dissection, étaient placés dans des capsules de porcelaine tarées, lavées à l'eau bidistillée et égouttées.

Par matière fraîche, il faut entendre le poids de l'organe privé par égouttage soigneux de son eau d'imprégnation.

Ces organes, desséchés à 60°, puis à 100°-105° constituent la matière sèche.

Dans une première série de dosages, la teneur de cuivre, de zinc, de nickel, et de cobalt, a été dosée, pour chaque espèce, sur l'animal entier, privé de sa coquille (*).

Une deuxième série d'analyses a été consacrée à l'étude de ces mêmes métaux, dans les différents organes des mollusques.

(*) Ces analyses ont été faites sur des lots de provenance identique à ceux réservés pour l'étude des organes. Pour *Mya arenaria* et *Pecten maximus*, les chiffres de teneur globale ont été calculés d'après ceux fournis par l'analyse des organes.

CHAPITRE PREMIER

LE CUIVRE, LE ZINC, LE NICKEL ET LE COBALT,
DANS QUELQUES ESPÈCES DE MOLLUSQUES
LAMELLIBRANCHES

CHAPIT

LE CUIVRE, LE ZINC, DANS QUELQUES ESPÈCES

	Prise d'essai		Cuivre en mgr.		
	matière fraîche en grs.	matière sèche en grs.	Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. matière fraîche	matière sèche
<i>Gryphea angulata</i> . Lam., variété blanche.					
Origine : Parcs, embouchure de la Seudre					
Age : 1 an.					
Date du prélèvement 3 décembre 1935		45,5	6,75	1,90	41,7
Taille { Longueur : 6 cm. 11					
Largeur : 3 cm. 84					
Épaisseur : 1 cm. 66					
Age : 2 ans.					
Date du prélèvement : 18 décembre 1935		31,7	4,92	1,23	33,1
Taille { Longueur : 7 cm. 43					
Largeur : 4 cm. 28					
Épaisseur : 2 cm. 36					
Age : 3 ans.					
Date du prélèvement : 12 janvier 1936		54,25	8,00	1,56	28,7
Taille { Longueur : 11 cm. 56					
Largeur : 5 cm. 11					
Épaisseur : 3 cm. 47					
<i>Gryphea angulata</i> . Lam., variété verte.					
Origine : Claires de Châtressac					
Age : 1 an.					
Date du prélèvement : 3 décembre 1935		39	5,25	1,52	38,9
Taille { Longueur : 5 cm. 66					
Largeur : 3 cm. 47					
Épaisseur : 1 cm. 69					
Age : 2 ans.					
Date du prélèvement : 18 décembre 1935		28,9	4,21	1,36	47,1
Taille { Longueur : 7 cm. 60					
Largeur : 4 cm. 27					
Épaisseur : 2 cm. 48					

PREMIER

NICKEL ET LE COBALT, MOLLUSQUES LAMELLIBRANCHES

Nickel en milligrammes			Cobalt en milligrammes			Zinc en milligrammes		
Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de	
	matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche
0,0223	0,49	3,30	0,0065	0,14	0,96	16,25	357	2406
0,003	0,080	0,62	0,0042	0,115	0,86	13,9	243	2824
0,0123	0,226	1,54	0,0055	0,102	0,69	16,5	305	2065
0,0154	0,335	2,47	0,00355	0,090	0,67	13,2	338	2515
0,006	0,21	1,44	0,0033	0,11	0,78	8,5	294	2026

	Prise d'essai		Cuivre en mgr.			
	matière fraîche	matière sèche	Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. matière fraîche	Pour 1000 gr. matière sèche	
Age : 3 ans. Date du prélèvement : 12 janvier 1936 Taille { Longueur : 10 cm. 39 { Largeur : 5 cm. 46 { Épaisseur : 2 cm. 97		42,2	6,89	1,76	41,4	253
<i>Ostrea edulis</i> . Lin. variété blanche. Origine : Parcs, embouchure de la Seudre Date du prélèvement : 5 février 1936 Age : 2 ans Taille { Longueur : 7 cm. 3 { Largeur : 7 cm. { Épaisseur : 2 cm.		32,8	5,40	0,531	16,2	95
<i>Ostrea edulis</i> . Lin. variété verte. Origine : Claires de Châtressac Date du prélèvement : 5 février 1936 Age : 2 ans. Taille { Longueur : 7 cm. 4 { Largeur : 7 cm. { Épaisseur : 2 cm.		38	5,48	0,870	22,9	158
variété verte. Origine : Indéterminée (marché de Royan) Date : 12 mars 1936 Age : 3 ans. Taille { Longueur : 7 cm. { Largeur : 6 cm. 5 { Épaisseur : 2 cm.		42,4	7,80	2,45	57,7	314
variété blanche. Origine : Parcs, embouchure de la Seudre. Date du prélèvement : 2 mars 1936 Age : 3 ans. Taille { Longueur : 8 cm. { Largeur : 7 cm. 5 { Épaisseur : 2 cm.		36,2	6,88	0,478	13,2	70
<i>Mya arenaria</i> . Lin. Origine : Ile de Ré. Date du prélèvement : 16 mars 1936 Taille { Longueur : 5 cm. 4 { Largeur : 10 cm. 1 { Épaisseur : 3 cm. 4		résultats calculés		»	1,33	7,03

Nickel en milligrammes			Cobalt en milligrammes			Zinc en milligrammes		
Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de	
	matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche
0,0074	0,175	1,07	0,00385	0,091	0,56	23,4	554	3398
0,0027	0,071	0,500	traces	0,030 env	0,20 env	6,6	51,9	285,4
0,0039	0,103	0,71	0,0014	0,036	0,255	9,1	239	1658
0,0014	0,033	0,18	0,0011	0,026	0,141	10,44	246	1338
0,0037	0,102	0,580	0,0031	0,085	0,45	4,47	123	649
»	0,168	0,87	»	0,032	0,173	»	9,7	51,3

		Prise d'essai		Cuivre en mgr.		
		Matière fraîche	Matière sèche	Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr.	
					matière fraîche	matière sèche
<i>Pecten maximus</i> Lin.						
Origine : Ile de Ré.						
Date du prélèvement : 16 mars 1936						
Taille	Longueur : 11 cm. 2	}	résultats	calculés	»	1,32
	Largeur : 12 cm. 5					
	Épaisseur : 3 cm. 5					
<i>Mytilus edule</i> Lin.						
Origine : Bouchots, région de Brouâges						
Date du prélèvement : 20 novembre 1935						
Age : 1 an.						
Taille	Longueur : 4 cm. 07	}	65,35	10	0,082	1,29
	Age : 1 an 1/2					
Taille	Longueur : 4 cm. 4	}	77,2	10	0,086	1,11
	Age : 2 ans.					
Taille	Longueur : 5 cm. 1	}	69,1	10,25	0,090	1,30
	Age : 3 et 4 ans.					
Taille	Longueur : 5 cm. 9	}	60,7	10,7	0,091	1,49
<i>Tapes decussatus</i> . Lin.						
Origine : Embouchure de la Seudre (Gallon d'Or)						
Date du prélèvement : 28 nov. 1935.						
Age : 1 an.						
Taille	Longueur : 2 cm. 41	}	45,1	9,41	0,081	1,79
	Largeur : 3 cm. 225					
	Épaisseur : 1 cm. 54					
Age 2 ans.						
Taille	Longueur : 3 cm. 26	}	45,04	9,25	0,074	1,64
	Largeur : 4 cm. 30					
	Épaisseur : 2 cm. 04					
Age : 3 ans.						
Taille	Longueur : 3 cm. 57	}	41,85	8,70	0,080	1,91
	Largeur : 4 cm. 92					
	Épaisseur : 2 cm. 31					
<i>Scrobicularia piperata</i> Gmel.						
Origine : Fonds de vase, du Gallon d'Or.						
Date du prélèvement : 26 mars 1936.						
Age : 1 an.						
Taille	Longueur : 2 cm. 14	}	28	5,25	0,041	1,46
	Largeur : 2 cm. 80					
	Épaisseur : 0 cm. 86					

Nickel en milligrammes			Cobalt en milligrammes			Zinc en milligrammes		
Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de	
	matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche
»	0,064	0,350	»	0,024	0,134	»	51,9	285
0,0075	0,118	0,750	0,0043	0,067	0,430	0,65	10,3	65
0,00575	0,078	0,575	0,0042	0,054	0,420	2,0	25,1	200
0,0088	0,129	0,86	0,0039	0,058	0,38	3,07	44,4	299
0,01125	0,185	1,046	0,0064	0,105	0,598	1,20	19,75	112
0,01075	0,238	1,142	0,0022	0,047	0,234	1,13	25,05	120
0,0174	0,386	1,88	0,0035	0,077	0,378	1,24	27,55	134
0,0255	0,610	2,93	0,0048	0,130	0,551	1,30	31,1	149,5
0,0160	0,570	3,04	0,008	0,285	1,52	0,50	17,8	95,2

			Prise d'essai		Cuivre en mgr.			
			Matière fraîche	Matière sèche	Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr.		
						matière fraîche	matière sèche	
Age : 2 ans								
Taille	Longueur : 2 cm.	82	}	34,8	7,06	0,144	4,13	20,5
	Largeur : 3 cm.	50						
	Épaisseur : 1 cm.	15						
Age : 3 ans								
Taille	Longueur : 3 cm.	35	}	34,7	7,05	0,135	3,88	19,2
	Largeur : 4 cm.	40						
	Épaisseur : 1 cm.	30						
<i>Cardium edule</i> Lin.								
Origine : Embouchure Seudre (Gallon d'Or)								
Date du prélèvement : 31 mars 1936								
Age 2 ans								
Taille	Longueur : 2 cm.	28	}	60,5	7,42	0,075	1,24	10,0
	Largeur : 2 cm.	64						
	Épaisseur : 1 cm.	78						
Age 3 ans								
Taille	Longueur : 2 cm.	84	}	35,8	4,30	0,045	1,23	10,4
	Largeur : 3 cm.	34						
	Épaisseur : 2 cm.	25						
<i>Cardium edule</i> Lin.								
Origine : Embouchure Seudre								
Date du prélèvement 13 juillet 1936			}	14,50	2,50	0,028	1,93	11,1
Age : 3 ans								
Origine : Embouchure Seudre								
Date du prélèvement : 1 ^{er} septembre 1936			}	14,0	2,31			
Age : 3 ans								
Origine : Embouchure Seudre								
Date du prélèvement : 15 septembre 1936			}	15	2,35			
Age : 3 ans								
Origine : Embouchure Seudre								
Date du prélèvement : 21 septembre 1936			}	15	2,39			
Age : 3 ans								
Origine : Gisement de Bonne-Anse (Royan-La Coubre)								
Date du prélèvement : 10 août 1936			}	12,90	2,40			
Age : 1 et 2 ans.								
<i>Patella vulgata</i> Lin.								
Origine : Ile de Ré								
Date du prélèvement : 15 mars 1936			}	31	6,63	0,021	0,0677	3,17
Taille	Diamètre : 3 cm.	69						
	Hauteur : 1 cm.	73						

Nickel en milligrammes			Cobalt en milligrammes			Zinc en milligrammes		
Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de	
	matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche
0,0165	0,474	2,35	0,0037	0,106	0,525	1,14	32,7	162
0,017	0,489	2,42	0,0031	0,088	0,44	1,54	44,4	220
0,120	2	16,2	0,0085	0,14	1,14	0,60	9,91	81
0,0646	1,8	15,3	0,0031	0,087	0,75	0,42	11,7	99,9
0,061	4,21	24,4	0,0075	0,517	3,0	non décelé		
0,0455	3,25	19,3						
0,039	2,6	16,6						
0,046	3,06	19,2						
0,0245	1,9	10,2						
0,0051	0,164	0,772	0,0028	0,090	0,423	0,48	15,1	72,5

Les résultats consignés dans ce tableau confirment la plupart des travaux antérieurs.

CUIVRE. — Exception faite pour *Ostrea edulis* Lin. et *Gryphea angulata* Lam., les chiffres obtenus pour les espèces lamellibranches analysées sont assez voisins et oscillent autour de 10 milligrammes pour 1.000 grammes de matière sèche (soit 1 mgr. 5 à 2 milligrammes par 1.000 grammes de matière fraîche) ; ces chiffres sont en accord avec ceux rapportés par WANG-TAI-SI (145).

Les huîtres et les gryphées, et surtout ces dernières, présentent un taux de cuivre très supérieur à celui des autres mollusques, comme l'ont signalé tous les auteurs qui se sont occupés de la question. Les chiffres obtenus sont en parfait accord avec ceux qu'ils indiquent, ainsi qu'avec les analyses effectuées par les laboratoires de l'Office Scientifique et Technique des Pêches maritimes, sur des huîtres dont la provenance était identique à celle des lots analysés ici.

NICKEL. — Les résultats antérieurs sont peu nombreux ; on ne trouve guère, comme recherche quantitative, que deux résultats consignés par G. BERTRAND et MACHEBŒUF (14) dans leur tableau d'ensemble. Ces auteurs donnent les chiffres suivants :

Moule.....	0 mg. 45 par kilog. de matière fraîche
Gryphée	0 mg. 30 » » »

En accord avec ces chiffres, les tableaux précédents montrent que la teneur en nickel des mollusques lamellibranches marins est de l'ordre de grandeur moyen de 0 mgr. 5 pour 1.000 grammes de matière fraîche.

Parmi les chiffres les plus faibles trouvés, figure celui obtenu pour *Pecten maximus* L. (0 mgr. 064 pour 1.000 grammes de matière fraîche) ; il est vraisemblable que ce résultat est dû au fait que, dans cette espèce, le muscle adducteur forme

une grande partie de la matière fraîche totale ; des analyses ultérieures ont confirmé d'ailleurs cette manière de voir.

Du point de vue opposé, une autre espèce fait nettement exception ; il s'agit de *Cardium edule* L., dont la teneur en nickel est environ dix fois supérieure à celle des autres mollusques. La teneur de ce mollusque est même supérieure à tous les chiffres publiés jusqu'à ce jour, tant pour les animaux que pour les végétaux (et même pour les Graines qui constituent les organes les plus riches). La quantité moyenne trouvée dans sept échantillons de *Cardium edule* analysés est, en effet, de 2 mgr. 7 pour 1.000 grammes de matière fraîche (soit 17 mgr. 3 pour 1.000 grammes de matière sèche). Ces organismes sont plus riches en nickel qu'en cuivre, ce qui est une exception tout à fait remarquable.

COBALT. — Les chiffres obtenus sont également en accord avec les deux analyses publiées par MM. G. BERTRAND et MACHEBŒUF :

Moule.....	0 mg. 136	par kilog. de matière fraîche
Gryphée	0 mg. 037	» » » »

Ce métal est donc moins abondant que le nickel.

D'une façon générale, le cobalt accompagne le nickel : les organismes riches en nickel le sont également en cobalt ; toutefois *Cardium edule* ne présente pas de phénomène d'accumulation très net. Pour une même espèce, il est également possible de retrouver, suivant les différents lots, des relations entre la teneur en nickel et la teneur en cobalt.

ZINC. — Les chiffres obtenus confirment la teneur élevée des mollusques, en général, et d'*Ostrea edulis* et surtout de *Gryphe angulata*, en particulier, signalée par divers auteurs (G. BERTRAND, VLADESCO (28, 144), WANG-TAI-SI(145), Y. BRANDT-BEAUZEMONT (39), HILTNER et WICHMANN (76), etc.).

VARIATION DE LA TENEUR EN MÉTAUX EN FONCTION DE L'ÂGE

Seules, peuvent être retenues les différences très nettes, supérieures à des différences dues aux variations individuelles des divers lots.

Pour le cuivre, les résultats manquent de netteté ; l'accroissement constaté chez *Mytilus edule* L., *Tapes decussatus* L., *Scrobicularia piperata* G. est trop faible pour qu'on puisse conclure à une augmentation avec l'âge.

Pour le nickel et le cobalt, on n'enregistre d'accroissement que pour *Mytilus edule* et *Tapes decussatus* ; dans ce dernier cas, l'accumulation en fonction de l'âge paraît assez nette.

Les résultats paraissent plus nets dans le cas du zinc : pour *Mytilus edule*, le taux de métal passe de 65 milligrammes à 259 milligrammes par kilog. de matière sèche (pour retomber à 112, chez les moules de 3 et 4 ans) (*) ; pour *Tapes decussatus*, le zinc croît de 120 à 150, pour *Scrobicularia piperata*, de 95 à 220, et pour *Cardium edule*, de 81 à 100 milligrammes. Cet ensemble de résultats est trop concordant pour qu'on puisse invoquer le hasard et il semble bien que le zinc ait tendance à s'accumuler dans les tissus des mollusques en fonction de l'âge. Chez les huîtres, l'énorme accumulation du métal, en provoquant de grandes variations, empêche toute étude. Y. BRANDT-BEAUZEMONT avait rencontré de semblables difficultés, lors de l'étude des variations saisonnières du zinc chez les huîtres (39).

(*) Aux dires du producteur qui a fourni les divers échantillons de *Mytilus edule*, les moules de 3 et 4 ans avaient souffert d'un séjour prolongé dans les bouchots, dans des conditions défavorables (pluies prolongées). De fait, elles présentaient un amaigrissement notable : le rapport du poids de la coquille au poids total qui était de 0,52, 0,51 et 0,55 pour les premiers trois lots, passait à 0,66 pour les moules de 3-4 ans.

Peut-être faut-il voir une relation entre l'accroissement de la teneur en zinc avec l'âge et l'augmentation de l'activité des glandes génitales des mollusques. On sait que Gabriel BERTRAND et VLADESCO (30) estiment que le zinc joue un rôle important dans les phénomènes de reproduction.

RELATIONS ENTRE LES TAUX DE FER, DE NICKEL ET DE COBALT CHEZ LES DIFFÉRENTS MOLLUSQUES ÉTUDIÉS

On a vu (131) que G. SCHIEKENTHAL a signalé qu'il existait, dans les divers sols étudiés par lui, une certaine relation entre les quantités de fer et de nickel présentes.

Il paraît intéressant de vérifier s'il n'en est pas de même chez les êtres vivants, où ces trois éléments — très voisins et qui sont rangés ensemble dans la classification périodique des éléments, — pourraient entrer dans des combinaisons analogues. On ne trouve pas dans la littérature de travaux se rapportant à la teneur comparée de ces métaux chez le même individu.

La méthode au zincate de calcium permettant l'isolement quantitatif du fer par précipitation par l'ammoniaque en présence de phosphates, j'ai pu doser cet élément dans tous les échantillons analysés. Pour cela, le précipité a été redissous dans l'acide sulfurique dilué et le fer dosé colorimétriquement sur une portion aliquote du liquide, par la méthode au cupferron.

Les tableaux ci-dessous indiquent les résultats de ces dosages ; le fer est exprimé en milligrammes par kilog. de matière sèche et les teneurs en nickel et cobalt, rapportées à cette même unité, sont placées en regard de la teneur en fer.

On a vu que pour les deux derniers éléments, la teneur dans

les diverses espèces présentait un certain parallélisme, qui se retrouve également dans une même espèce, suivant les différents lots d'individus d'âges ou d'origines différents. Mais il est remarquable de constater que ce parallélisme est également net entre les teneurs en fer d'une part, et en nickel ou cobalt d'autre part, pour la presque totalité des échantillons analysés.

Si, faisant la moyenne des divers chiffres obtenus pour la teneur en chacun de ces métaux, dans les différents lots d'individus d'une même espèce, on classe les espèces analysées par teneur croissante en nickel, on constate que la teneur en cobalt et aussi la teneur en fer varient dans le même sens.

*Teneurs moyennes en fer, nickel et cobalt
des espèces analysées*

	En mgr. pour 1000 gr. de matière sèche		
	Nickel	Cobalt	Fer
<i>Pecten maximus</i> Lin.	0,35	0,134	115
<i>Ostrea edulis</i> Lin. verte	0,45	0,195	550
— — — blanche	0,51	0,320	526
<i>Mytilus edule</i> Lin.	0,80	0,457	593
<i>Mya arenaria</i> Lin.	0,87	0,173	1505
<i>Gryphea angulata</i> Lam. verte.	1,24	0,67	579
— — — blanche	1,36	0,84	582
<i>Tapes decussatus</i> Lin.	1,85	0,39	927
<i>Scrobicularia piperata</i> Gmel.	2,60	0,83	2510
<i>Cardium edule</i> Lin.	14,7	0,95	1650

Le chiffre élevé de fer chez *Mya arenaria* est probablement accidentel ; cet animal vit dans des vases riches en ce métal et possède un siphon musculeux de grandes dimensions, très difficile à débarrasser par lavages de la vase qu'il contient.

Teneurs comparées en fer, nickel et cobalt
des espèces analysées

	En mgr. pour 1000 gr. de matière sèche		
	Fer	Nickel	Cobalt
<i>Gryphea angulata</i> Lam. blanche			
1 an	624	3,30	0,96
2 ans	527	0,62	0,86
3 ans	596	1,54	0,69
<i>Gryphea angulata</i> Lam. verte			
1 an	720	2,47	0,67
2 ans	400	1,44	0,78
3 ans	618	1,07	0,56
<i>Ostrea edulis</i> Lin. blanche			
2 ans	520	0,50	0,20
3 ans	532	0,58	0,45
<i>Ostrea edulis</i> Lin. verte			
2 ans	615	0,71	0,25
3 ans	485	0,18	0,14
<i>Mytilus edule</i> Lin.			
1 an	520	0,750	0,43
1 an 1/2	420	0,575	0,42
2 ans	498	0,860	0,38
3 et 4 ans	934	1,045	0,598
<i>Tapes decussatus</i> Lin.			
1 an	872	1,14	0,23
2 ans	921	1,88	0,38
3 ans	988	2,93	0,55
<i>Scrobicularia piperata</i> Gmel.			
1 an	2620	3,04	1,52
2 ans	2480	2,35	0,525
3 ans	2430	2,42	0,44
<i>Cardium edule</i> Lin.			
2 ans	1735	16,2	1,14
3 ans	1570	15,3	0,75
3 ans	1990	24,4	3,0

A cette exception près, on voit que les espèces riches en nickel sont également riches en fer et en cobalt.

Cardium edule fait également exception ; l'espèce est riche en fer, mais la teneur en nickel y est extraordinairement plus élevée que dans les autres mollusques.

Dans une même espèce, les variations individuelles semblent également se montrer parallèles, pour les trois métaux ; les exemples fournis par *Mytilus edule*, *Tapes decussatus*, *Cardium edule* sont particulièrement démonstratifs.

Un semblable parallélisme n'a pas pu être mis en évidence pour les autres métaux : les quantités de cuivre et de zinc varient suivant les espèces, sans rapport entre elles, ni avec les autres éléments étudiés.

CHAPITRE II

II. — LE CUIVRE, LE ZINC, LE NICKEL ET LE
COBALT DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DES
MOLLUSQUES LAMELLIBRANCHES.

CHAPITRE

LE CUIVRE, LE ZINC, LE DANS LES PRINCIPAUX ORGANES DE

	Prise d'essai		Cuivre en milligrammes		
	matière fraîche en grs.	matière sèche en grs.	Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. d	
				matière fraîche	matière sèche
<i>Gryphea angulata</i> . Lam. variété blanche.					
Age 1 an.					
{ Branchies, manteau, palpes labiaux.....	46,7	5,72	2,06	44,1	361,5
{ Hépatopancréas et organes génitaux.....	32,8	5,87	1,25	38,1	213
Age : 2 ans.					
{ Branchies, palpes labiaux.....	34,4	3,905	1,01	29,4	259
{ Manteau	49,3	5,70	2,6	52,7	456
{ Hépatopancréas et organes génitaux	26,7	4,0	0,63	23,2	157,5
Age : 3 ans					
{ Branchies, palpes labiaux.....	57,25	7,30	2,20	38,4	301
{ Manteau	36,35	5	1,59	43,75	318
{ Hépatopancréas et organes génitaux	30,55	5	0,45	14,75	90
<i>Gryphea angulata</i> . Lam. variété verte.					
Age : 1 an.					
{ Branchies, manteau, palpes labiaux.....	40	5,50	1,94	48,5	363
{ Hépatopancréas, organes génitaux	38	5,0	1,1	28,9	220
Age : 2 ans.					
{ Branchies, palpes labiaux.....	46	5,60	2,26	49,15	475
{ Manteau	63,1	7,80	3,72	58,9	477
{ Hépatopancréas, organes génitaux	28,1	4,55	1,39	49,5	309
Age : 3 ans.					
{ Branchies, palpes labiaux.....	45,45	7,50	1,61	35,4	214
{ Manteau	60	8,50	2,48	41,35	292
{ Hépatopancréas, organes génitaux.....	28,25	5	1,26	44,6	252

XIÈME

NICKEL ET LE COBALT,

PLUSQUES LAMELLIBRANCHES

Nickel en mgr.			Cobalt en mgr.			Zinc en mgr.		
	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de	
	matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche
3	0,492	4,035	0,0053	0,113	0,929	15,83	339	2974
51	0,488	2,74	0,0061	0,186	1,04	12,5	381	2219
24	0,063	0,615	traces			11,1	323	2849
36	0,073	0,632	0,002	0,040	0,35	22,45	456	3940
225	0,085	0,562	0,0056	0,21	1,4	9,33	349	2332
30	0,575	4,5	0,0052	0,10	0,71	24,76	432,5	3392
79	0,218	1,58	0,0091	0,25	1,82	9,37	257,7	1874
24	0,078	0,48	traces			8,28	271	1656
1	0,528	3,84	0,004	0,100	0,726	12,7	317,5	2039
75	0,125	0,950	0,0031	0,082	0,620	13,7	360,5	2750
85	0,322	2,65	0,004	0,087	0,714	12,07	261	2155
25	0,210	1,70	0,0051	0,081	0,65	24,07	382	3085
5	0,178	1,1	0,0038	0,135	0,842	11,55	411	2563
7	0,215	1,3	0,0064	0,14	0,85	22,66	498	3021
95	0,135	0,935	0,0078	0,13	0,92	25,73	429	3027
5	0,17	1,00	0,0011	0,04	0,22	19,35	682,5	3870

	Prise d'essai		Cuivre en milligram		
	matière fraîche	matière sèche	Dans la prise d'essai	Pour 1000 g	
				matière fraîche	matière sèche
<i>Ostrea edulis</i> . Lin., variété blanche.					
Age : 2 ans.					
{ Branchies, palpes labiaux.....	33,5	4,20	0,47	14	112
{ Manteau	31	4,25	0,48	15,5	115
{ Hépatopancreas, organes génitaux	26,5	5	0,46	17,35	90
Age : 3 ans.					
{ Branchies, palpes labiaux.....	43,10	6,10	0,49	11,37	80
{ Manteau	41,0	6,00	0,79	19,0	132
{ Hépatopancreas, organes génitaux	30,24	7,00	0,34	11,2	48
<i>Ostrea edulis</i> . Lin., variété verte.					
Age : 2 ans.					
{ Branchies, palpes labiaux.....	49,5	5,15	1,0	20,2	194
{ Manteau	36,7	4,60	0,45	12,3	98
{ Hépatopancreas, organes génitaux.....	35,5	5,65	0,91	28	161
Age : 3 ans.					
{ Branchies, palpes labiaux.....	43,2	5,65	3,18	73,5	563
{ Manteau	43,0	6,00	2,26	52,5	376
{ Hépatopancreas, organes génitaux	22,6	5,00	1,38	61,1	276
<i>Pecten maximus</i> . Lin.					
{ Branchies, manteau	60,5	5,60	0,048	0,79	8
{ Hépatopancreas	24,8	5,03	0,162	7,53	32
{ Bosse de Polichinelle (org. génitaux).....	40,8	7,05	0,130	3,18	18
{ Muscle.....	45,0	10	0,029	0,64	2
<i>Mya arenaria</i> . Lin.					
{ Siphons	75,3	15	0,090	1,19	6
{ Branchies.....	47,25	6,65	0,056	1,18	8
{ Manteau	44,2	8,00	0,052	1,17	6
{ Hépatopancreas	38,1	8,00	0,098	2,58	12
{ Pied, organes génitaux, intestins.....	42,8	8,00	0,083	1,94	10
{ Muscle.....	24,5	4,75	non décelé		

Nickel en mgr.			Cobalt en mgr.			Zinc en mgr.		
Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de	
	matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche
044	0,13	1,05	traces	0,015 env.	0,12 env.	9,77	292,5	2079
0165	0,053	0,39	non décelé			3,28	106	772
020	0,075	0,400	non décelé			5,65	213	1130
045	0,104	0,738	0,0046	0,106	0,754	5,43	119	841
059	0,142	0,984	0,0036	0,086	0,600	6,22	150	1037
025	0,083	0,307	0,0023	0,076	0,330	3,43	113,5	490
058	0,117	1,01	0,0023	0,046	0,445	10,7	215	2069
051	0,14	1,1	0,0035	0,096	0,76	6,46	176	1404
0355	0,103	0,65	0,0011	0,034	0,195	9,17	281	1623
014	0,032	0,248	0,0026	0,060	0,460	13,65	315,9	2416
023	0,053	0,384	non décelé			10,26	238,6	1710
015	0,052	0,230	non décelé			5,0	221,2	1000
09	0,148	1,6	0,0031	0,051	0,55	0,60	10	107
064	0,258	1,28	0,0038	0,153	0,76	3,7	149	740
022	0,054	0,315	non décelé			2,8	68,8	400
décelé			non décelé			2,5	55	250
144	0,19	0,96	0,0021	0,028	0,11	0,24	3,2	16
098	0,208	1,47	0,0046	0,097	0,69	0,525	11,1	78,9
0725	0,164	0,910	non décelé			0,48	10,8	60
089	0,23	1,11	0,0036	0,09	0,45	0,65	17,1	81,65
0355	0,083	0,45	non décelé			1,25	29,2	156,2
0095	0,037	0,20	non décelé			non décelé		

	Prise d'essai		Cuivre en milligrammes		
	matière fraîche	matière sèche	Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de matière fraîche	Pour 1000 gr. de matière sèche
<i>Scrobicularia piperata</i> Gmel.					
Age : 1 an.					
Siphons, branchies, manteau	37,80	7,00	0,085	2,25	12,15
Pied, hépato, organes génitaux, intestins	27,1	6,00	0,077	2,84	12,9
Age : 2 ans.					
Siphons, branchies, manteau	38,6	7,00	0,155	4,01	22,15
Hépatopancreas	23,1	5,00	0,125	5,41	25
Pied, organes génitaux, intestins	34,8	8,00	0,100	2,60	12,5
Age : 3 ans.					
Siphons	32,75	6,00	0,054	1,65	9
Branchies, manteau	27,41	5,00	0,148	5,50	29,6
Hépatopancreas	21,80	5,00	0,098	4,49	19,6
Organes génitaux, pied, intestins	23,89	5,00	0,062	2,59	12,4
<i>Cardium edule</i> Lin.					
Age : 2 ans.					
Branchies, manteau	54,2	6,35	0,031	0,57	4,88
Hépatopancreas	24,9	3,20	0,054	2,17	16,87
Pied, organes génitaux	43,2	5,31	0,065	1,06	12,26
Age : 3 ans.					
Branchies, manteau	46,4	5,09	0,042	0,90	8,23
Hépatopancreas	25,5	4,15	0,053	2,08	12,7
Pied, organes génitaux	30,8	4,75	0,051	1,65	10,7
<i>Patella vulgata</i> Lin.					
Tête	22,2	3,40	0,024	1,08	7,47
Pied	41,1	8,00	0,01 env	0,25 env	1,25 env
Masse viscérale	46,2	13,00	0,062	1,35	4,77

Nickel en mgr.			Cobalt en mgr.			Zinc en mgr.		
Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		Dans la prise d'essai	Pour 1000 gr. de		
matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche		matière fraîche	matière sèche	
0,463	2,5	0,0122	0,322	1,74	0,76	20,1	108,5	
0,756	3,41	0,0079	0,291	1,31	0,52	19,2	86,6	
0,438	2,41	0,0031	0,080	0,443	0,65	16,8	92,85	
0,941	4,35	0,0064	0,277	1,28	1,94	83,5	388	
0,151	0,725	non décelé			0,48	12,5	60	
0,093	0,516	non décelé			non décelé			
0,598	3,28	0,0031	0,113	0,620	0,65	19,8	130	
0,986	4,30	0,0043	0,197	0,860	2,00	91,7	400	
0,129	0,620	non décelé			0,56	23,43	112	
1,75	14,95	0,0022	0,041	0,346	0,16	2,9	25,2	
3,01	23,45	0,0108	0,433	3,37	0,44	17,6	137,5	
1,58	13,4	0,0031	0,073	0,585	0,60	14,1	113,2	
1,16	13,23	non décelé			0,20	4,3	39,2	
2,85	17,47	0,0078	0,305	1,87	0,57	22,35	137,3	
2,43	15,8	0,0036	0,116	0,758	0,65	21,1	136,8	
0,326	2,13	non décelé			non décelé			
0,075	0,387	non décelé			non décelé			
0,324	1,14	0,0072	0,156	0,553	2,4	52,2	184,5	

Les résultats consignés dans ces tableaux font ressortir des localisations très nettes qui confirment, pour le cuivre et le zinc, les travaux antérieurs.

CUIVRE. — Les tissus glandulaires sont les plus riches et parmi ceux-ci, l'hépatopancréas ; les branchies et le manteau présentent aussi une teneur notable ; dans les espèces où ces deux organes ont pu être isolés et analysés séparément, la teneur en cuivre semble à peu près identique.

Les tissus musculaires, par contre, renferment peu de cuivre ; ce fait a déjà été signalé, pour plusieurs métaux et notamment pour le fer, le manganèse et le zinc (Gabriel BERTRAND et divers collaborateurs).

ZINC. — On retrouve l'accumulation, déjà signalée par Gabriel BERTRAND et VLADESCO, dans l'hépatopancréas et les organes génitaux. Un exemple très net est celui de *Mya arenaria*, dans lequel la séparation des organes a pu être poussée assez loin, en raison de la taille de l'animal.

Comme dans le cas du cuivre, les tissus musculaires sont pauvres en zinc.

NICKEL. — L'organe le plus riche est l'hépatopancréas, puis viennent les branchies et le manteau. Il est à noter que les organes génitaux sont relativement pauvres en nickel, ainsi que les tissus musculaires.

COBALT. — La localisation de ce métal est parallèle à celle du nickel, mais son taux est notablement plus faible ; dans plusieurs cas, les prises d'essai se sont montrées insuffisantes.

VARIATION DES MÉTAUX AVEC L'ÂGE, DANS DIFFÉRENTS ORGANES

L'examen des tissus glandulaires montre quelques particularités intéressantes, surtout pour *Cardium edule* et *Scrobicularia piperata* où l'hépatopancréas et les organes génitaux ont été analysés séparément.

Dans l'hépatopancréas, les teneurs en cuivre, nickel et zinc varient peu en fonction de l'âge ; le taux de cobalt se montre moins constant, mais cette variation ne suggère aucune explication.

Pour les organes génitaux, au contraire, on constate un accroissement de la teneur en zinc, en fonction de l'âge, particulièrement net pour *Scrobiculata piperata*.

RELATIONS ENTRE LES TENEURS EN FER, NICKEL ET COBALT DES DIFFÉRENTS ORGANES

Dans la grande majorité des cas, les teneurs de ces trois métaux sont parallèles ; ceci confirme les remarques précédemment faites, lors de l'étude de ces éléments dans les animaux entiers (Tableaux p. 126 et 127).

L'analyse des organes de *Mya arenaria* montre bien que le chiffre de fer trouvé lors de l'analyse globale est entaché d'une erreur par excès provenant de la vase qui souille l'animal ; c'est en effet le siphon qui renferme le plus de fer ; cet organe est toujours imprégné de vase et pratiquement impossible à nettoyer ; il est constitué de tissus musculaires dont la teneur normale en fer doit être assez faible.

		En mgr. pour 1.000 gr. de matière sèche		
		Fer	Nickel	Cobalt
<i>Gryphea angulata</i> Lam., blanche				
1 an	{ Branchies. Manteau	822	4,03	0,93
	{ Masse viscérale	477	2,74	1,04
2 ans	{ Branchies.	743	0,615	non décelé
	{ Manteau	761	0,632	0,35
3 ans	{ Masse viscérale	660	0,562	1,4
	{ Branchies.	830	4,5	0,71
	{ Manteau	896	1,6	1,82
	{ Masse viscérale	372	0,48	non décelé
<i>Gryphea angulata</i> Lam. verte				
1 an	{ Branchies. Manteau	968	3,84	0,726
	{ Masse viscérale	476	0,95	0,62
2 ans	{ Branchies.	464	2,65	0,714
	{ Manteau	666	1,70	0,65
3 ans	{ Masse viscérale	310	1,10	0,84
	{ Branchies.	693	1,30	0,85
	{ Manteau	790	0,935	0,92
	{ Masse viscérale	532	1,00	0,22
<i>Ostrea edulis</i> Lin. blanche				
2 ans	{ Branchies.	420	1,05	traces
	{ Manteau	487	0,39	non décelé
	{ Masse viscérale	390	0,40	non décelé
3 ans	{ Branchies.	518	0,74	0,75
	{ Manteau	470	0,98	0,60
	{ Masse viscérale	425	0,31	0,33
<i>Ostrea edulis</i> Lin. verte				
2 ans	{ Branchies.	536	1,00	0,44
	{ Manteau	595	1,1	0,76
	{ Masse viscérale	490	0,65	0,195
3 ans	{ Branchies.	472	0,25	0,46
	{ Manteau	485	0,38	non décelé
	{ Masse viscérale	378	0,23	non décelé
<i>Pecten maximus</i> Lin.				
	{ Branchies. Manteau	282	1,60	0,55
	{ Hépatopancréas	255	1,28	0,76
	{ Bosse de Polichinelle	121	0,315	non décelé
	{ Muscle	52	non décelé	non décelé

		En mgr. pour 1.000 gr. de matière sèche		
		Fer	Nickel	Cobalt
<i>Mya arenaria</i> Lin.				
	Siphons	2545	0,96	0,14
	Branchies.....	580	1,47	0,69
	Manteau	1160	0,91	non décelé
	Hépto-pancréas	850	1,11	0,45
	Pied, organes génitaux	880	0,45	non décelé
	Muscle	326	0,20	non décelé
<i>Scrobicularia piperata</i> Gmel.				
1 an	{ Siphon, branchies, manteau	3215	2,50	1,74
	{ Masse viscérale	2330	3,40	1,31
2 ans	{ Siphons, branchies, manteau	3070	2,40	0,445
	{ Hépto-pancréas	4240	4,35	1,28
	{ Organes génitaux, pieds	335	0,725	non décelé
3 ans	{ Siphons	1090	0,516	non décelé
	{ Branchies, manteau	3920	3,28	0,62
	{ Hépto-pancréas	3460	4,30	0,86
	{ Organes génitaux, pied	632	0,62	non décelé
<i>Cardium edule</i> Lin.				
2 ans	{ Branchies. Manteau	1440	14,95	0,345
	{ Hépto-pancréas	2220	23,45	3,37
	{ Pied, organes génitaux	1885	13,4	0,585
3 ans	{ Branchies. Manteau	1300	13,25	non décelé
	{ Hépto-pancréas	2170	17,50	1,87
	{ Pied, organes génitaux	1505	15,80	0,758

CHAPITRE III

LA TENEUR DES HÙÎTRES EN FER, CUIVRE ET ZINC ET LE PHÉNOMÈNE DU VERDISSEMENT

La nature du phénomène qui provoque la coloration des branchies, des palpes labiaux et de l'intestin terminal de l'huître a suscité depuis plus d'un siècle de nombreuses recherches et est aujourd'hui parfaitement éclaircie. On sait que la cause en est due à la sécrétion d'un pigment bleu par une diatomée : *Navicula fusiformis* Grünow qui pullule dans les « claires » à certaines époques de l'année.

Certains auteurs, cependant, ont voulu voir dans l'accumulation du fer ou du cuivre dans les tissus des huîtres la seule cause de leur coloration et, bien qu'une telle hypothèse ne puisse plus être soutenue aujourd'hui, il paraît intéressant de vérifier les analyses de ces auteurs. La nature du pigment bleu de la Navicule est, en effet, encore à peu près inconnue et on peut se demander si un métal n'entre pas dans la constitution de sa molécule.

Parmi les auteurs ayant fait jouer aux métaux un rôle dans le verdissement des huîtres, il faut citer en premier lieu Bizio, de l'Institut de Venise, qui prétend, en 1845, que les huîtres ne sont vertes que parce qu'elles ont accumulé du cuivre. En 1900, Raphaël Dubois (53) analyse les huîtres de Marennes vertes et blanches et trouve, pour les huîtres vertes une plus forte teneur en cuivre (13 mgr. 8 pour 100 grammes contre 9 mgr. 65).

Ad. CHÂTIN et MUNTZ voient dans la seule action du fer

la cause du verdissement des huîtres ; dans une série de notes à l'Académie des Sciences, en 1894, ils donnent du phénomène une explication presque exclusivement minérale, la cause primordiale étant, d'après eux, une oxydation des sels ferreux en sels ferriques.

HILTNER et WICHMANN (76), en 1919, puis SEVERY (132), en 1923, analysent des huîtres américaines, y trouvent une proportion élevée de zinc et de cuivre et mentionnent que les huîtres présentant une teinte verdâtre sont riches en cuivre et ont un goût très désagréable ; mais ils ne s'expliquent pas davantage quant à la provenance de ces huîtres, et il est impossible de se rendre compte s'il s'agit de véritables huîtres vertes ou d'huîtres ayant été accidentellement souillées (par des eaux usées d'usines, par exemple).

Julius NELSON en 1915 (114) a également dosé le cuivre dans les huîtres vertes ; il donne les chiffres suivants :

Huîtres vertes	40 mgr. de Cu par kg. de matière fraîche
Huîtres incolores	9 mgr. » » »

Mais il est amené à faire des restrictions : toutes les huîtres vertes ne sont pas plus riches en cuivre que les huîtres incolores, et, en tout cas cela ne veut pas dire que le pigment contient du cuivre. L'auteur indique ensuite quelques caractères de solubilité : c'est un pigment bleu, soluble dans l'aldéhyde formique, l'alcool, l'éther, le glycérol, mais insoluble dans l'eau. J. NELSON ne donne pas d'explications sur la provenance exacte de ses huîtres et le rôle de la Navicule bleue, mais il semble bien que les huîtres vertes analysées soient colorées par le pigment de cette Navicule.

ROSE et BODANSKY, en 1920 (49), dosent également le cuivre dans les huîtres, trouvent de 20 à 60 milligrammes par kilog. mais ne parlent pas du verdissement.

Il y a quelques années, l'Office des Pêches fut saisi d'une pétition des ostréiculteurs de la région de Marennes ; une usine de la Société de Saint-Gobain, traitant des pyrites cui-

vreuses, déversait ses eaux usées dans le canal de Marennes. L'Office scientifique et technique des Pêches Maritimes fut conduit ainsi à doser le cuivre dans les huîtres de la région, et voici les résultats de ces analyses qui m'ont été communiqués par M. CHAUX-THÉVENIN, Inspecteur du Contrôle Sanitaire, à La Tremblade.

	Cuivre en mgr. pour 1000 gr. (<i>Gryphea angulata</i>)	
	Matière fraîche	Matière sèche
1) Dosage pondéral du Cu après séparation électrolytique.		
Viviers à Ronce-les-Bains	40	220
» » la Beurette (côte de Marennes)	60	349
Concessions Seudre	75	480
» l'Eguille	62	484
Gryphées du Canal de Marennes :		
300 mètres aval usine		15.000
1500 — — —		8.000
3000 — — —		5.000
2) Dosage colorimétrique.		
Viviers à Ronce-les-Bains	19	
Canal de Marennes (300 m. aval usine)	1150	
Clares alimentées par la Seudre	27	
Port de Royan	126	
Banc du Bœuf en Gironde (*)	260	

(*) Il est à noter que les huîtres des bancs de la Gironde sont riches en cuivre. Sans doute cet apport en cuivre (région industrielle de Bordeaux) est-il la cause de l'extraordinaire développement des gisements naturels de Gryphées, à la suite de l'ensemencement accidentel de l'estuaire survenu en 1868.

Les huîtres vivant au voisinage du déversoir de l'usine avaient accumulé des proportions énormes de cuivre ; elles présentaient une teinte verdâtre et une saveur stypique, mais il est évident qu'il ne s'agit pas là de véritables « huîtres vertes ».

Pour ces dernières, il n'a pas été fait d'études systématiques en fonction de l'âge et de l'origine des huîtres.

RECHERCHES SUR LES RELATIONS ENTRE LE VERDISSEMENT ET LA TENEUR EN MÉTAUX

Ayant eu l'occasion d'analyser divers échantillons d'huîtres vertes et blanches provenant de la même région, je rapporte ici les chiffres obtenus, en rapprochant les teneurs des deux variétés de même âge :

		Métal pour 1.000 gr. de matière sèche en milligrammes	
		Huîtres vertes	Huîtres blanches
<i>Gryphea angulata</i> Lam.			
1 an	{ Fer.....	720	624
	{ Cuivre.....	289	281
	{ Zinc.....	2515	2410
2 ans	{ Fer.....	400	527
	{ Cuivre.....	324	249
	{ Zinc.....	2026	2825
3 ans	{ Fer.....	618	596
	{ Cuivre.....	253	195
	{ Zinc.....	3398	2065
<i>Ostrea edulis</i> Lin.			
2 ans	{ Fer.....	615	520
	{ Cuivre.....	158	95
	{ Zinc.....	1658	1220

Il n'apparaît pas de différences très nettes entre les teneurs des différentes variétés ; cependant, on constate un taux légèrement plus élevé pour le cuivre, chez les huîtres vertes.

Le verdissement intéressant plus particulièrement les branchies, c'est dans ces organes qu'on devrait trouver, comparativement, les plus fortes différences. Le tableau suivant

rapporte les résultats obtenus et rapproche les teneurs en métaux des organes pour les deux variétés.

		Métal en mgr. pour 1000 gr. de matière sèche			
		Branchies		Masse viscérale	
		Huîtres vertes	Huîtres blanches	Huîtres vertes	Huîtres blanches
<i>Gryphea angulata</i>					
1 an	Fer.....	970	820	480	480
	Cuivre.....	364	361	220	215
	Zinc.....	2040	2795	2750	2220
2 ans	Fer.....	460	745	310	660
	Cuivre.....	475	260	310	160
	Zinc.....	2155	2850	2565	2330
3 ans	Fer.....	695	830	530	370
	Cuivre.....	215	300	250	90
	Zinc.....	3020	3390	3870	1655
<i>Ostrea edulis.</i>					
2 ans	Fer.....	536	420	472	390
	Cuivre.....	195	110	106	90
	Zinc.....	2070	2080	1625	1130

Aucune conclusion ne peut être tirée. Les branchies des huîtres vertes ne sont pas plus riches en cuivre que celles des huîtres blanches ; il semble au contraire que ce soit la masse viscérale qui accuse les différences les plus notables.

Ces analyses sont d'ailleurs entachées d'une erreur à la base provenant du fait que l'origine des huîtres n'est pas connue avec certitude ; les huîtres (*Ostrea*) cultivées dans le bassin de la Seudre peuvent être originaires d'Arcachon ou de Bretagne ; les Gryphées peuvent également avoir des origines différentes ; parfois même les ostréiculteurs les récoltent sur les bancs naturels et se contentent de les mettre à engraisser dans les claires.

Il peut y avoir par conséquent, à l'origine, un apport en

métaux très variable, enlevant toute signification aux chiffres obtenus.

L'étude demandait à être reprise dans de meilleures conditions. A cet effet, je me suis fait adresser de La Tremblade plusieurs échantillons de Marennes et Gryphées, dont l'origine était connue, et les diverses phases de l'élevage aussi bien précisées que possible (*).

Les huîtres vertes et blanches, étudiées comparativement, devaient obligatoirement provenir du même lot d'origine.

Les huîtres, dites « de Marennes » (*Ostrea edulis*) étaient toutes originaires de Locmariaquer, en Bretagne; les huîtres « portugaises » (*Gryphea angulata*) provenaient de naissain recueilli au Château d'Oléron (*).

La dissection fut faite avec soin et les organes répartis en deux lots : d'une part ceux susceptibles d'être intéressés par la pigmentation (Branchies, manteau, palpes labiaux, intestin terminal) et, d'autre part, la masse viscérale.

OSTREA EDULIS Lin.

Échantillon n° 1

Origine : Locmariaquer.

Mise en viviers : le 25 avril 1937 à la Casse-Dufour.

Mise en claires : le 22 septembre 1937.

Huîtres vertes provenant de la claire n° 50 à Luzac.			Huîtres blanches provenant de la claire n° 67 à La Tremblade.		
Taille moyenne	Longueur	7 cm. 1	Taille moyenne	Longueur	7 cm. 1
	Largeur	7 cm.		Largeur	6 cm. 95
Branchies,	Fer.....	429			283
	Cuivre	129			103
Manteau, palpes	Zinc	1930			3550
	Fer.....	228			220
Masse viscérale	Cuivre	88			136
	Zinc	961			5230

(*) Ces échantillons m'ont été fournis par M. Y. CHAILLÉ, à La Tremblade, à qui j'adresse tous mes remerciements pour son amabilité.

Échantillon n° 2

Huîtres originaires de Locmariaquer et provenant des viviers de la Casse-Dufour. Placées, au mois de septembre 1937, dans une claire à La Tremblade où elles ne verdirent pas ; une partie de ces huîtres fut alors retirée des claires et placées dans des claires à Luzac, où elles verdirent, pendant 45 jours environ.

Huîtres vertes		Huîtres blanches	
Taille moyenne	Longueur 6 cm. 9	Longueur 7 cm.	
	Largeur 7 cm.	Largeur 7 cm.	
Branchies, Manteau, palpes	Fer.....	335	253
	Cuivre	110	53
	Zinc	2690	1120
Masse viscérale	Fer.....	130	85
	Cuivre	80	67,5
	Zinc	2055	830

Échantillon n° 3

Huîtres vertes.		Huîtres blanches.	
Claire n° 92. La Tremblade.		Claire n° 66. La Tremblade.	
Taille moyenne	Longueur 7 cm.	Taille moyenne	Longueur 7 cm. 3
	Largeur 6 cm. 85		Largeur 6 cm. 9
Branchies, Manteau, palpes	Fer.....	544	245
	Cuivre	65	200
	Zinc	1695	2090
Masse viscérale	Fer.....	153	154
	Cuivre	54	80
	Zinc	1076	962

Pour les trois échantillons analysés, on constate que le taux du fer dans les branchies est plus élevé pour les huîtres vertes que pour les huîtres blanches, alors que la teneur en fer de la masse viscérale se montre beaucoup plus constante. Les teneurs comparées de cuivre et de zinc, par contre, ne laissent rien voir de précis.

GRYPHEA ANGULATA. Lam.

Échantillon n° 4

Origine : le Château d'Oléron.

Mise en claire à La Tremblade, le 22 septembre 1937.

Huitres vertes			Huitres blanches		
Taille moyenne	Longueur	8 cm. 35	Taille moyenne	Longueur	8,25
	Largeur	5 cm. 40		Largeur	5,50
Claire n° 119			Claire n° 138		
Branchies,	Fer.....	257			748
	Cuivre	320			395
Manteau, palpes	Zinc	6650			4860
Masse viscérale	Fer.....	340			696
	Cuivre	538			460
	Zinc	8330			6670

Échantillon n° 5

Origine : viviers du Château d'Oléron.

Mise en claire le 9 novembre 1937.

Huitres vertes			Huitres blanches		
Claire n° 45 à La Tremblade			Claire n° 153, La Tremblade		
Taille	Longueur	8 cm. 6	Taille	Longueur	8 cm. 5
	Largeur	6 cm.		Largeur	4 cm. 95
Branchies,	Fer.....	468			748
	Cuivre	532			400
Manteau, palpes	Zinc	1855			4860
Masse viscérale	Fer.....	365			695
	Cuivre	360			460
	Zinc	4080			6670

Échantillon n° 6

Huîtres vertes Claire à Luzac			Huîtres blanches Claire n° 148 à La Tremblade		
Taille {	Longueur	9 cm. 45	Taille {	Longueur	9 cm. 55
	Largeur	5 cm. 40		Largeur	5 cm. 45
Branchies, Manteau, palpes	{ Fer.....	436			270
	{ Cuivre	736			301
	{ Zinc	6850			5340
Masse viscérale	{ Fer.....	520			480
	{ Cuivre	260			200
	{ Zinc	5650			3010

Aucun des métaux étudiés ne présente de différences systématiques suivant la variété verte ou blanche.

EXAMEN DES VASES DE CLAIRES

L'examen d'un échantillon de vase provenant d'une claire verte et enrichie en *Navicula ostrearia* a révélé la présence d'une quantité importante de fer : 3,84 % du poids de vase séchée à 100°. Il est probable qu'une fraction importante du métal est à l'état de sulfures : la vase est noirâtre et devient brune lorsqu'on l'expose à l'air. L'épuisement par l'acide sulfurique dilué entraîne une partie du fer ; après plusieurs traitements, on a obtenu 2 % de fer soluble et 1,9 % de métal insoluble dans l'acide.

La recherche du cuivre et du zinc sur 5 grammes de vase sèche a été négative ; ces deux métaux sont donc présents en quantité très faible, bien inférieure à celle du fer et l'accumulation du zinc dans les huîtres possède de ce fait un caractère tout à fait remarquable.

Il n'est pas possible d'établir une différence dans la teneur en fer des vases de claires vertes et des vases de claires blanches. Quelques analyses ont donné les résultats suivants :

Vase de claires vertes	Vase de claires blanches
Fer % de la vase sèche	Fer % de la vase sèche
3,94	3,22
2,78	3,12
3,21	3,45

Il est, du reste, très difficile d'obtenir un échantillon moyen de la vase des claires en raison de leur surface importante et un résultat définitif ne saurait être acquis qu'en faisant la moyenne de plusieurs centaines d'analyses.

L'étude du pigment eût été fort intéressante à entreprendre, mais elle est rendue très délicate en raison de la fragilité des navicules qui s'altèrent pendant le transport. Je me suis fait adresser plusieurs échantillons de vases riches en navicules bleues, mais, malgré toutes les précautions prises, les diatomées me parvinrent toujours presque totalement dépigmentées.

L'épuisement à l'alcool méthylique dilué de telles vases donne une liqueur verte qui, traitée par le benzène, abandonne à ce dernier solvant un pigment vert foncé, doué d'une fluorescence rouge intense et qui fut identifié par son spectre d'absorption et son spectre de fluorescence, avec de la chlorophylle.

La fraction benzénique obtenue par traitement d'un volume de vase correspondant au poids sec de 2 gr. 75, pesait 0 gr. 090 et ne renfermait que des traces très faibles de fer (1 à 3 γ) ; la fraction méthylique restant après épuisement benzénique pesait 0 gr. 6295 et contenait 36 γ de fer.

Un essai analogue fut repris comparativement sur des vases de claires vertes et des vases de claires blanches. Les deux échantillons furent agités au moulinet hydraulique avec de l'alcool méthylique à 60 % ; la vase fut épuisée plusieurs fois, jusqu'à ce que l'alcool n'entraîne plus de matière colorante.

L'extrait hydro-alcoolique ainsi obtenu fut épuisé au ben-

zène, puis au chloroforme. Les résultats de cette étude sont résumés ci-dessous.

	Vases à claires vertes	Vases à claires blanches
Fraction benzénique	0 gr. 074 Fer 0	0 gr. 050 Fer 0
Fraction chloroformique	0 gr. 015 Fer 0	0 gr. 0027 Fer 0
Fraction méthylque	0 gr. 7696 Fer 25 γ	0 gr. 2825 Fer 32 γ
Vase restante	10 gr. 97 Fer 0 gr. 324	13 gr. 21 Fer 0 gr. 312

Il est vraisemblable, d'après ce que l'on sait des caractères de solubilité du pigment bleu de la navicule, qu'on devrait le rencontrer dans la fraction méthylque aqueuse ; mais cette fraction, en raison de l'altération des navicules est à peine colorée. En tout cas, la quantité de fer qu'elle contient est trop faible pour qu'on puisse conclure à l'existence d'un pigment ferrugineux.

L'eau de mer des claires, baignant les vases ferrugineuses, se montre très riche en fer. La recherche du métal, après filtration, pour éliminer les éléments figurés, puis précipitation par la chaux a donné 0 mgr. 80 de fer par litre. Mais le fer semble se trouver surtout à l'état de combinaison organique ; le même échantillon d'eau de mer filtrée, après évaporation et destruction sulfo-nitro-perchlorique contenait 5 mgr. 45 de fer au litre.

L'étude comparative du fer contenu dans l'eau des claires vertes et blanches eût sans doute permis de savoir s'il y avait une relation entre la quantité de fer organique et la présence du pigment bleu de la navicule. Malheureusement, en raison d'une exceptionnelle sécheresse, la « verdure » disparut des claires dès le début du printemps, et il m'a été impossible de me procurer les échantillons nécessaires.

CONCLUSION

Il est aujourd'hui démontré que le verdissement des huîtres n'est pas dû, comme on l'a cru jadis à l'accumulation de tel ou tel métal (notamment du cuivre et du fer) dans les tissus de huîtres ; aussi les analyses précédentes n'ont-elles pas été entreprises dans ce but, mais dans celui de chercher à savoir : ou bien si le pigment comporte un groupement prosthétique organo-métallique, ou bien si le fait d'être pigmentée entraîne chez l'huître une modification du métabolisme de certains métaux. Ces analyses ont été faites sur un petit nombre d'échantillons, mais soigneusement choisis pour éliminer, autant qu'il est possible, les causes de variations individuelles. De ces analyses, il semble qu'on puisse tirer les conclusions suivantes :

Pour *Gryphea angulata*, le verdissement ne paraît pas s'accompagner de modifications constantes de la teneur des trois métaux étudiés.

Pour *Ostrea edulis*, il paraît en être de même dans le cas du zinc ; les résultats sont douteux pour le cuivre, mais par contre, dans les trois échantillons analysés, la teneur en fer des branchies a été trouvée plus grande chez les huîtres vertes.

Ceci ne démontre pas que le pigment soit ferrugineux ; au contraire, les résultats discordants obtenus pour *Gryphea angulata* font supposer que, si le pigment contient du fer, la quantité ainsi fixée sur les branchies des huîtres est trop faible pour compenser les différences dues aux variations individuelles.

Quant à l'étude chimique du pigment, qui seule apporterait la solution du problème, elle ne saurait être entreprise que sur place. Trop d'inconnues demeurent encore, qu'il faudra éliminer une à une ; outre la constitution chimique

pour laquelle on en est encore réduit aux hypothèses, on ignore toujours les conditions physico-chimiques exactes qui déterminent dans les claires, l'apparition de la navicule pigmentée. S'il est exact que quelques-unes de ces conditions, telles que l'influence du mucus de huîtres, le pH et la salinité optimum, ont pu être précisées, il n'en reste pas moins vrai qu'on peut observer journellement des phénomènes qui défient encore toute analyse. C'est ainsi que, de deux claires voisines ayant la même orientation et recevant la même eau d'alimentation, l'une peut s'enrichir rapidement en navicules pigmentées et la seconde rester stérile ; le fait de transporter dans cette dernière des navicules provenant de la première claire peut parfois suffire pour y déclencher l'apparition de la verdeur ; mais parfois aussi les navicules ensemencées disparaissent en quelques heures, sans qu'on puisse trouver d'explication à ces comportements différents.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DU NICKEL DANS LES TISSUS
DE *CARDIUM EDULE* Lin.

Parmi les espèces de mollusques lamellibranches étudiées dans les pages précédentes, il en est qui présentent, pour l'un ou l'autre des éléments dosés, une teneur particulièrement remarquable. Entre autres, nous avons relevé, au cours de cette étude, la richesse des huîtres (et particulièrement de *Gryphea angulata*) en cuivre et en zinc, et la teneur en nickel de *Cardium edule*, qui domine notablement tous les autres chiffres obtenus pour ce métal.

Il est intéressant de rechercher à quel état se trouve, dans la matière vivante, le métal ainsi accumulé, et cette recherche peut mettre sur la voie du rôle physiologique qu'il peut être appelé à jouer, dans les tissus de l'animal.

La présence du zinc en quantités élevées, chez les Gryphées, a fait l'objet d'un travail approfondi de M^{me} Y. BRANDT-BEAUZEMONT (39) ; cet auteur, ayant extrait, par des traitements appropriés, les principaux groupes de principes immédiats constituant la matière vivante, a constaté, pour certaines fractions, des teneurs en zinc assez notables et conclut que la majeure partie de ces substances possède des caractères protéidiques indéniables et qu'il est à peu près certain que le zinc qu'elles renferment fait partie de leur molécule.

Il paraît intéressant de tenter, pour le nickel, une recherche analogue ; une telle étude semble n'avoir jamais été entreprise et la cause en est probablement dans le fait que la matière vivante ne renferme que des traces infimes de ce métal et que leur dosage est assez délicat. Les coques, dont la teneur en nickel par kilogramme de chair fraîche oscille autour de trois milligrammes, constituent pour une telle étude un matériel de choix ; la technique colorimétrique de dosage pou

être pratiquée sur des prises d'essais relativement faibles des divers extraits obtenus.

Quelques essais préalables ont été tentés, dans le but de savoir si le métal ainsi accumulé dans les tissus de *Cardium edule* se trouve à l'état organique. A cet effet, des produits de broyage de chair fraîche de coques, délayés dans de l'eau bidistillée ont été soumis à la dialyse dans des sacs de collodion ; les sacs plongeaient dans de l'eau bidistillée qui était renouvelée et analysée tous les jours.

La pulpe obtenue par broyage renfermait théoriquement 84 γ de nickel ; l'expérience a duré cinq jours, la pulpe étant additionnée d'une trace de chloropicrine, pour éviter la putréfaction (*).

Si l'on convient de définir comme nickel minéral celui qui restera en solution lorsqu'on additionnera d'un excès d'ammoniaque concentrée la liqueur de dialyse et sera précipité par la chaux de cette solution ammoniacale, puis mis en évidence par la diméthylglyoxime, on peut constater qu'aucun des liquides obtenus au cours des dialyses successives ne renferme de nickel susceptible d'être ainsi décelé.

(*) G. BERTRAND et M^{me} ROSENBLATT ont, en effet, attiré l'attention (*C. R. Ac. Sc.*, 170, p. 1350 et p. 1468, 1920) sur les propriétés hautement antiseptiques de la chloropicrine vis-à-vis des fermentations provoquées par les levures ou les bactéries.

CHAPITRE PREMIER

LE NICKEL DANS LE SANG DE *CARDIUM EDULE*

Avant d'entreprendre toute étude, il y avait lieu de se demander si le nickel est surtout localisé dans les tissus du *Cardium edule* ou dans l'hémolymphe qui les baigne. On a vu, en effet, que HILTNER et WICHMANN (76), puis WANG-TAI-SI (145), avaient trouvé dans l'hémolymphe des mollusques lamellibranches divers métaux liés à des substances protidiques auxquelles on pouvait, avec vraisemblance, assigner un rôle de pigments respiratoires. On peut se demander si, chez *Cardium edule*, le nickel n'est pas susceptible de former de telles combinaisons.

A cet effet, j'ai cherché à prélever l'hémolymphe de *Cardium edule* dans état de pureté aussi grand que possible. Si l'on se borne à recueillir le liquide qui s'écoule de l'animal sur lequel on a pratiqué un certain nombre de lésions, on obtient un sang plus ou moins mêlé d'eau de mer d'imprégnation ; pour une raison analogue, le liquide obtenu par broyage et égouttage des tissus ne saurait représenter du sang à l'état de pureté. Il semble plus indiqué d'avoir recours à une ponction et, en particulier, à une ponction dans le cœur de l'animal, organe dont on aperçoit très nettement les battements sur l'animal auquel on a enlevé une des valves avec précaution, en évitant de le blesser. Mais une telle ponction, en raison de la petitesse de l'organe et de son peu de consistance, est difficile à réaliser, surtout lorsqu'il faut la répéter sur un grand nombre d'individus. Il est possible, également, de pratiquer des ponctions dans le pied de l'animal, organe érectile et très vascularisé.

De nombreuses ponctions furent faites, à l'aide d'aiguilles de verre, tant dans le cœur que dans le pied de l'animal pour obtenir finalement 18 cc. d'un liquide incolore, opalescent, qui fut abandonné à la coagulation dans la glacière.

Les quelques essais qui purent être effectués à partir de l'hémolymphe sont résumés ci-dessous :

Le liquide coagulé est centrifugé.	Nickel
On obtient { globules sérum	
Étude des globules	
Hémolysés par l'eau bidistillée { liquide d'hémolyse 0 résidu globulaire (poids sec = 0 gr. 1550)..... (0,5 à 1)	
Étude du sérum	
Neutralisé par $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ à 0,05 %	
Précipitation des globulines { on obtient 0 gr. 1229 de globulines par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ pur { séchées à 100° 1,1	
On ajoute SO_4H_2 N/5 pour précipiter les albumines	
Centrifuger { Albumines = quelques flocons non pondérables 0 Liqueur = soumise à l'ébullition ne donne pas de précipité	
La liqueur est évaporée à sec et on détruit la matière organique par la technique sulfo-nitro-perchlorique.....	10,7

La presque totalité du nickel se trouve donc dans cette liqueur finale qui ne présente plus les propriétés des substances protidiques complexes.

La quantité de sang recueillie a été trop faible pour qu'il soit possible de doser avec certitude le nickel dans toutes les fractions. On peut cependant constater que la quantité totale de nickel contenue dans les 18 cc. d'hémolymphe peut être évaluée à 12 γ , ce qui donne par litre 0 mgr. 665. Cette quantité est inférieure aux chiffres moyens trouvés pour les organes, de sorte qu'on peut admettre que le nickel est accumulé dans ces derniers (et particulièrement dans l'hétopancréas) et ne joue vraisemblablement aucun rôle en tant que constituant d'un pigment respiratoire hypothétique de l'hémolymphe.

CHAPITRE II

ÉTUDE DES EXTRAITS AQUEUX ET ALCOOLIQUES DE TISSUS DE *CARDIUM EDULE*

Des essais de dialyse mentionnés plus haut, on peut conclure que le nickel contenu dans les tissus de *Cardium edule* se trouve lié d'une façon quelconque à des molécules organiques qu'il faudrait s'efforcer de déterminer.

Pour apporter quelques éclaircissements à la question, il importe de faire, à partir des tissus de coques, plusieurs extractions au moyen de solvants convenables de manière à sérier les grands groupes de principes immédiats ; obligatoirement, ces extraits devront être obtenus à partir de matières fraîches, car la dessiccation s'accompagne de modifications plus ou moins profondes de certains de ces principes immédiats ; en outre, il faudra, autant que possible, éviter l'autolyse des tissus qui entraînerait également des modifications importantes de la composition initiale des tissus et le mode opératoire choisi pour l'obtention des extraits devra protéger ces derniers contre une attaque possible par les ferments libérés.

La technique choisie a été analogue à celle décrite par Mme Y. BRANDT-BEAUZEMONT (39) pour l'étude biochimique du zinc dans les tissus des Gryphées : la substance fraîche à épuiser est jetée dans le solvant bouillant et ainsi l'action des ferments est immédiatement entravée par la chaleur.

A. — EXTRACTION PAR L'EAU

L'extraction a été faite à partir de 50 grammes de tissus frais et égouttés de *Cardium edule*, après ablation de la coquille ; un dosage de nickel pratiqué sur une portion aliquote de la prise d'essai a donné pour les 50 grammes de matière fraîche le chiffre de 130 γ de nickel (en réalité la prise d'essai totale ne renfermait que 103 γ de métal).

La matière fraîche est jetée dans 5 fois son poids d'eau bidistillée bouillante et on entretient l'ébullition pendant quinze minutes sous réfrigérant ascendant ; après quoi, on filtre et on soumet la matière cuite restée sur le filtre à une deuxième extraction avec deux fois et demie le poids d'eau distillée bouillante, dans les mêmes conditions que précédemment. On filtre de nouveau et la matière restée sur le filtre est soumise à une troisième extraction identique à la précédente. Le liquide provenant de cette troisième extraction est presque incolore et on peut admettre alors que tout le nickel soluble est passé en solution aqueuse. Y. BRANDT-BEAUZEMONT était arrivée, pour le zinc, à des conclusions analogues.

Les trois liqueurs aqueuses sont alors réunies et concentrées dans le vide, jusqu'à siccité, et on obtient ainsi l'extrait aqueux sec.

ÉTUDE DE L'EXTRAIT AQUEUX

L'extrait sec pesait 1 gr. 906. Il semble qu'il puisse contenir le nickel engagé dans les combinaisons suivantes :

- 1^o nickel minéral ou minéralisé par l'eau bouillante ;
- 2^o nickel de certaines substances protidiques, solubles dans l'eau bouillante ;

3^o nickel engagé dans des combinaisons glucidiques solubles.

L'extrait a été soumis à la dialyse dans des sacs de colloïdion plongeant dans de l'eau bidistillée, cette eau étant remplacée tous les trois jours et les produits étaient additionnés de chloropicrine, pour éviter les phénomènes de fermentation.

Le nickel a été dosé dans les liquides de dialyse, après destruction sulfonitro-perchlorique, et les dosages ont donné les résultats suivants :

	Matière sèche dialysée (après dessiccation à 100-105°)	Nickel dialysé	Nickel % de la matière sèche dialysée	Nickel % du nickel total
1 ^{re} dialyse.....	1 gr. 00	22 γ	0,0022	21,3
2 ^e »	0 gr. 508	9 γ 8	0,0019	9,5
3 ^e »	0 gr. 151	6 γ 8	0,0044	6,6
4 ^e »	0 gr. 094	3 γ 1	0,0033	3,0
5 ^e »	0 gr. 011	néant		

Au total, 41,7 de nickel, soit 40,48 % du nickel total contenu dans la prise d'essai se trouvent dans des combinaisons solubles dans l'eau bouillante et dialysables.

Si l'on traduit ces résultats par un graphique, on obtient une courbe de la quantité du nickel dialysé en fonction du temps, qui présente une allure identique à celle obtenue pour le zinc, dans les mêmes conditions, par Y. BRANDT-BEAUZEMONT.

Cet auteur, considérant que les derniers points de la courbe sont en ligne droite, suggère de prolonger cette droite jusqu'à son point de rencontre avec l'ordonnée correspondant à la première dialyse. La différence entre le chiffre obtenu et le chiffre réel de nickel obtenu lors de la première dialyse représenterait la fraction du métal qui se présente à l'état minéral et est, de ce fait, très facilement dialysable.

Dans le cas présent, cette fraction serait de 9%, soit 8,7 % du nickel total de la prise d'essai. Il n'est toutefois pas possible de tirer une conclusion, la quantité d'extrait ayant été trop faible pour qu'on puisse y rechercher le nickel minéral.

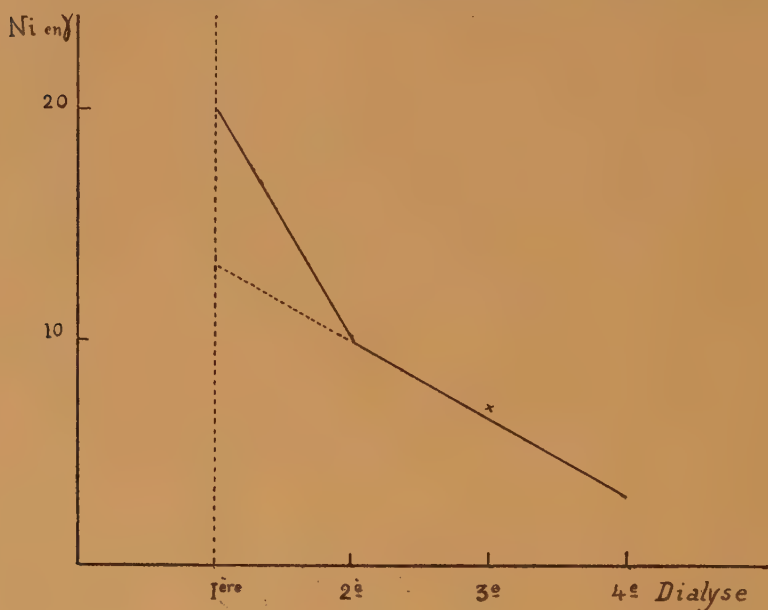


Fig. 5

Après les cinq dialyses, une partie de l'extrait est restée dans les sacs de collodion, cette fraction indialysable pesait 0 gr. 142 et renfermait 6 γ 2 de nickel, soit, 0,0044 % de la matière sèche et 6 % du nickel total. La majeure partie du nickel contenu dans l'extrait est donc dialysable.

ÉTUDE DU RÉSIDU D'EXTRACTION AQUEUSE

Ce résidu, qui constitue la matière cuite dans l'eau, renfermera, entre autres fractions, la totalité du nickel combiné aux protides coagulables par la chaleur ou à d'autres groupes

de principes immédiats (lipidiques ou glucidiques) insolubles dans l'eau.

Pour voir de quelle façon le métal se partage entre ces deux fractions, on a intérêt à faire subir au produit une digestion pepsique qui dégrade et solubilise les molécules protidiques les plus complexes.

Le résidu de l'extraction aqueuse pesant vingt grammes à l'état frais a été dilacéré à l'aide de lames de verre tranchantes, dans le but de faciliter l'attaque par la pepsine, puis soumis à deux digestions pepsiques successives, de six heures chacune : les digestions ont été réalisées en présence de 250 cc. d'eau et de 1 gramme de pepsine à 100 %, en milieu chlorhydrique à 2 ‰ et à la température de 50° (conditions fixées par le Codex).

Après filtration, les deux liquides de digestion ont été réunis et évaporés dans le vide ; on a ainsi obtenu 3 gr. 41 de matière sèche, renfermant 51 γ de Ni, soit 49,5 % du nickel total de la prise d'essai de *Cardium edule* et 0,0015 % de la matière sèche.

Le résidu de digestion pepsique resté sur le filtre a été également analysé ; après dessiccation à 100-105°, il pesait 2 gr. 256 et ne renfermait que 4 γ 3 de nickel, soit 0,00019 % du poids de la matière sèche et 4,17 % du nickel total de la prise d'essai. Ce résidu devait contenir, entre autres principes immédiats : les substances lipidiques, les glucides polymérisés insolubles dans l'eau et certaines substances protidiques ayant pu résister à l'hydrolyse pepsique (mucines, scléroprotéides, etc.).

Quoi qu'il en soit, il ressort de ces essais d'une manière très nette qu'une fraction importante du nickel se trouve liée à des molécules protidiques, coagulables par la chaleur et hydrolysables par la pepsine.

L'étude de l'extraction aqueuse a donc montré :

1° Que la moitié environ du nickel total est soluble dans l'eau bouillante et dialysable ;

2° Que la seconde moitié est insoluble dans l'eau bouillante et hydrolysable par la pepsine.

L'étude de ces deux fractions sera reprise et précisée plus loin, à partir de prises d'essai beaucoup plus considérables.

B. — EXTRACTION PAR L'ALCOOL

L'extrait a été obtenu à partir de coques renfermant 3 mgr. 25 de nickel par kilogramme de matière fraîche ; la quantité théorique de nickel contenue dans les 48 grammes qui constituaient la prise d'essai était donc de 156 γ. La quantité réelle trouvée a été de 166 γ.

Les coques, privées de leurs coquilles, ont été jetées dans 5 fois leur poids d'alcool à 96° bouillant (alcool redistillé et vérifié exempt de nickel) ; l'ébullition fut entretenue pendant trente minutes, sous réfrigérant à reflux, puis le mélange a été filtré, le résidu traité deux fois de suite par 150 cc. d'alcool bouillant. Les liqueurs alcooliques furent réunies, évaporées dans le vide. On a finalement obtenu :

a) l'extrait alcoolique sec	1 gr. 952
b) le résidu sec d'extraction alcoolique	5 gr. 750.

1. — ÉTUDE DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE

L'extrait sec obtenu par évaporation dans le vide est repris par l'eau et le produit trouble (lipides en suspension) est soumis à la dialyse, dans les mêmes conditions que l'extrait aqueux.

Les liquides de dialyse, prélevés tous les trois jours et analysés après destruction sulfonitro-perchlorique, ont donné les résultats suivants :

	Matière sèche dialysée	Nickel dialysé	Nickel % de la matière sèche dialysée	Nickel % du Ni total
1 ^{re} dialyse	0 gr. 849	30 γ 5	0,0036	18,4
2 ^e —	0 gr. 232	7 γ 9	0,0034	4,76
3 ^e —	0 gr. 120	6 γ 3	0,00525	3,8
4 ^e —	0 gr. 041	1 γ 9	0,0046	1,14

Au total, 46 γ 6 de nickel, soit 28,1 % du nickel total sont dialysables.

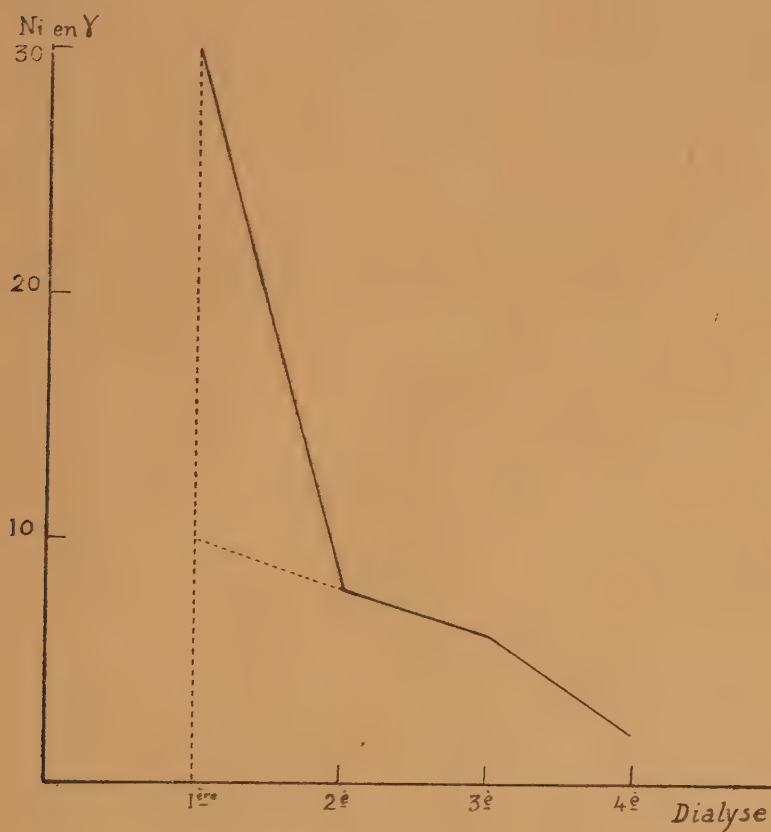


Fig. 6

Si l'on trace, comme pour l'extrait aqueux, la courbe de dialyse, on obtient un graphique présentant la même allure.

Si l'on prolonge la courbe des dernières dialyses, elle coupe l'ordonnée correspondant à la première dialyse, en un point qui représente environ 10 γ de nickel. Il est possible que la différence de 20 γ 5, entre ce chiffre et le chiffre réel de nickel dialysé représente la fraction minérale du nickel.

Après la dialyse, une partie de l'extrait reste dans les sacs de collodion. Cette fraction indialysable doit contenir, entre autres, la totalité des lipides qui pourront être isolés par traitement à l'éther. Le liquide indialysable est évaporé à sec, dans le vide, et le résidu repris par l'éther ; on obtient ainsi deux fractions dans lesquelles le nickel est dosé, après destruction, et accuse la répartition suivante :

	Matière sèche	Nickel	Nickel % de la matière sèche	Nickel % du nickel total
Indialysable :				
a) soluble dans l'éther	0 gr. 255	1 γ 5	0,00059	0,90
b) insoluble dans l'éther	0 gr. 498	13 γ 7	0,00275	8,25

On peut conclure d'ores et déjà que les lipides ne renferment qu'une proportion minime de métal.

ÉTUDE DU RÉSIDU D'EXTRACTION ALCOOLIQUE

Ce résidu doit contenir la totalité des protides, à l'exception de ceux qui auraient été solubilisés par l'alcool « par suite de leur association avec les lipides, ou autres composés organiques » (Y. BEAUZEMONT) ; il renferme également la totalité du glycogène. Des extractions par des solvants convenables permettent de séparer quelques groupes de principes immédiats.

EXTRACTION PAR L'EAU PURE. — Le résidu sec d'extraction alcoolique pesant 5 gr. 75 a été pulvérisé, puis soumis à plusieurs extractions avec, pour chaque opération, 50 cc. d'eau bidistillée, additionnée d'une trace de chloropicrine, pour éviter le développement des moisissures. Le mélange était agité mécaniquement pendant trois heures, puis centrifugé et la poudre soumise à une nouvelle agitation avec de l'eau pure.

Dix extractions ont été nécessaires pour entraîner la totalité des substances; le dernier liquide extractif était incolore, non opalescent et ne laissait à l'évaporation aucun résidu sensible.

Un tel traitement a amené en solution le glycogène et les albumines, qu'il est facile de séparer par addition d'alcool.

Pour cela, les liqueurs obtenues sont concentrées dans le vide, au dixième de leur volume et le glycogène est précipité, par addition de deux volumes d'alcool à 95°, sous forme de masses floconneuses, d'un blanc jaunâtre, qui sont séparées par centrifugation. On obtient ainsi deux fractions :

1° Les eaux-mères hydroalcooliques de précipitation du glycogène, dont le résidu sec pèse 1 gr. 102 et renferme 35 γ de nickel, soit 0,0032 % de la matière sèche et 21, 1 % du nickel total.

2° Du glycogène impur, qui est repris par l'eau chaude en vue d'une nouvelle précipitation.

La reprise par l'eau chaude conduit à l'obtention de deux fractions :

- a) d'une part, un résidu, devenu insoluble, peu abondant ;
- b) d'autre part, une solution opalescente de glycogène.

La solution de glycogène traitée par deux volumes d'alcool à 95° fournit un précipité de glycogène purifié et des eaux-mères hydroalcooliques de la 2^e précipitation. L'analyse de ces diverses fractions a donné les chiffres suivants :

	Matière sèche	Nickel	Nickel % de la matière sèche	Nickel % du nickel total
Eaux-mères de 1 ^{re} précipitation	1 gr. 102	35 γ	0,0032	21,1
Résidu insoluble . . .	0 gr. 0098	0		
Eaux-mères de 2 ^e précipitation	0 gr. 155	10 γ 5	0,0068	6,4
Glycogène	0 gr. 257	2 γ	0,00078	1,2

La presque totalité du nickel insoluble dans l'alcool et soluble dans l'eau se trouve donc dans les eaux-mères de précipitation du glycogène qui doivent renfermer les albumines ; le glycogène, en précipitant, marque une certaine tendance à entraîner ces substances (les eaux-mères de deuxième précipitation renferment, en effet, des composés d'une teneur en nickel relativement élevée), et les 2 γ trouvés dans le glycogène proviennent sans doute d'une purification incomplète.

Le résidu d'extraction du glycogène, devenu insoluble dans l'eau ne pesant que 9 milligrammes 8, il n'a pas été possible d'y déceler le nickel ; c'est dans cette fraction que M^{me} Y. BRANDT-BEAUZEMONT a trouvé, pour les Gryphées, le plus fort pourcentage en zinc et en cuivre (*).

EXTRACTION PAR LE CHLORURE DE SODIUM A 1 %. — Ce traitement a pour but de dissoudre les globulines ; il se pratique sur la matière déjà épuisée par l'eau pure et dans les mêmes conditions : dix agitations de 3 heures avec, chaque fois, 50 cc. de solution à 1 % de ClNa ; le liquide est séparé par centrifugation, après chaque extraction et les liquides réunis sont concentrés dans le vide ; on obtient (déduction faite des 5 cc. de ClNa ajoutés) 0 gr. 921 d'extrait sec, ren-

(*) Cet auteur indique, en effet, pour ce résidu, les teneurs de 3,77 % de zinc et 5,08 % de cuivre. Si l'on rapproche ces pourcentages des résultats analytiques du chapitre précédent qui montrent que le Gryphée renferme environ dix fois plus de zinc que de cuivre, on constate qu'il y a, dans ce résidu, une accumulation tout à fait remarquable du cuivre.

fermant 12 γ de nickel (*), soit 0,0013 % de la matière sèche et 7,23 % de nickel total.

EXTRACTION PAR LA SOUDE A 1 %. — Cette opération a pour but de dissoudre les produits ayant résisté aux deux traitements précédents. Il faudra veiller à ce que l'alcalinité ne dépasse pas 1 %, pour éviter l'hydrolyse de ces protides et encore constatera-t-on toujours une attaque plus ou moins importante.

Chaque extraction a duré trois heures ; la poudre est agitée mécaniquement avec 50 cc. de soude à 1 % ; la substance organique se gonfle et devient visqueuse. Le mélange est alors soumis à la centrifugation et le liquide neutralisé immédiatement par l'acide acétique dilué (**) ce qui détermine la formation d'un abondant précipité jaunâtre.

Le culot de centrifugation est, de son côté, délayé dans une nouvelle quantité de soude à 1 % et on pratique une deuxième extraction.

Six extractions ont été faites, suivant ce mode opératoire ; la liqueur provenant de la dernière extraction ne donnait plus de précipité de neutralisation. Toutes les liqueurs neutralisées ont été alors réunies et le précipité de neutralisation, recueilli par centrifugation. On obtient de la sorte 1 gr. 395 de précipité sec, de couleur jaune verdâtre, renfermant 14 γ 5 de nickel, soit 0,00104 % de la matière sèche et 8,74 % de nickel total. Ce précipité doit être constitué par les protamines et les glycoprotéides (mucines, mucoïdes).

Aux eaux-mères opalescentes, provenant de la centrifugation du précipité de neutralisation, l'addition de deux volumes d'alcool à 95° détermine l'apparition d'un précipité

(*) Les 5 grammes de ClNa utilisés au cours de cette extraction renfermaient 2 γ 3 de nickel, quantité pratiquement négligeable et qui fut déduite du chiffre total de nickel dosé dans l'extrait.

(**) Les quantités nécessaires de soude et d'acide acétique furent vérifiées du point de vue de leur pureté ; elles ne contenaient pas de nickel.

blanc, peu abondant, dont le poids sec est de 0 gr. 021 et dans lequel il n'a pas été possible de mettre le nickel en évidence. Ce précipité doit renfermer les nucléoprotéides.

Le liquide hydroalcoolique restant a laissé, après concentration dans le vide, un résidu sec pesant 4 gr. 604, ce qui représente, déduction faite de l'acétate de sodium formé pendant la neutralisation, 1 gr. 554 de matière sèche. Ce résidu sec renfermait 22 γ 5 de nickel, soit 0,0014 % de son poids et 13,25 % de nickel total. Dans cette fraction, le métal était vraisemblablement lié aux peptones et aux prolamines.

RÉSIDU INSOLUBLE DANS LA SOUDE A 1 %. — Le produit verdâtre et mucilagineux, restant insoluble après action de la soude, doit renfermer surtout des scléroprotéides qui auront résisté à toutes les tentatives de solubilisation.

Après dessiccation dans le vide sulfurique, puis à l'étuve à 100°, on obtient 0 gr. 209 de matière sèche, contenant 7 γ 5 de nickel, soit 0,0036 % et 4,22 % de nickel total.

CONCLUSION

De l'examen du tableau général résumant cette étude, on peut facilement déduire qu'une fraction importante du nickel contenu dans les tissus de *Cardium edule* est liée à des substances protidiques. Le fractionnement du résidu d'extraction alcoolique semble montrer que le métal est présent dans plusieurs groupes de protides.

Le glycogène et les lipides ne retiennent pas de nickel ou, tout au moins, n'en fixent que des quantités très faibles.

Quant au nickel contenu dans l'extrait aqueux ou alcoolique et dialysable, il est possible qu'il représente la fraction minérale du nickel total, mais il peut tout aussi bien faire partie de produits de dégradation des substances protidiques et cette question mérite d'être examinée de plus près.

	Matière sèche en gr.	Nickel dans la matière sèche en γ	Nickel % de la matière sèche	Nickel % du nickel total
Extraction aqueuse				
1 ^o Extrait aqueux				
1 ^{re} dialyse	1,00	22	0,0022	21,35
2 ^e dialyse	0,508	9,8	0,0019	9,51
Dialysable } 3 ^e dialyse	0,151	6,8	0,0044	6,60
4 ^e dialyse	0,094	3,1	0,0033	3,00
5 ^e dialyse	0,011	non décelé	»	»
Indyalisable	0,142	6,2	0,0044	6,02
2 ^o Résidu d'extraction aqueuse				
a) Hydrolysable par la pep- sine	3,410	51	0,0015	49,51
b) Résidu de la digestion pep- sique	2,256	4,3	0,00019	4,17
Extraction alcoolique				
1 ^o Extrait alcoolique				
1 ^{re} dialyse	0,849	30,5	0,0036	18,38
Dialysable } 2 ^e dialyse	0,232	7,9	0,0034	4,76
3 ^e dialyse	0,120	6,3	0,00525	3,79
4 ^e dialyse	0,041	1,19	0,00465	1,14
Indialysable :				
Soluble dans l'éther	0,255	1,5	0,00059	0,90
Insoluble dans l'éther	0,498	13,7	0,00275	8,25
2 ^o Résidu d'extraction alcoo- lique				
a) Soluble dans l'eau :				
Glycogène purifié	0,257	2	0,00078	1,20
Eaux-mères de précipita- tion du glycogène.....	1,102	35	0,0032	21,08
Eaux-mères de reprécipi- tation du glycogène ...	0,155	10,5	0,00677	6,38
Résidu précipité par l'al- cool non redissous par l'eau	0,0098	non décelé		
b) Soluble dans ClNa à 1 %				
Résidu sec	0,921	12	0,0013	7,23
c) Soluble dans OHNa à 1 %				
Précipité de neutralisation par CH ³ CO ² H	1,395	14,5	0,00104	8,74
Précipité par l'alcool ...	0,021	non décelé		
Eaux mères hydroalcool- iques	1,554	22,5	0,0014	13,25
d) Résidu des trois extrac- tions précédentes :				
Résidu sec	0,209	7	0,00358	4,22

CHAPITRE III

Il semblait nécessaire de reprendre, pour en préciser les conclusions, l'étude de ces combinaisons organiques du nickel sur des quantités plus importantes de produits.

Un extrait aqueux de tissus frais de *Cardium edule* a été préparé, en suivant la technique déjà décrite, à partir de 500 grammes de matière fraîche et on a obtenu les deux fractions suivantes :

Extrait aqueux sec	34 gr. 56
Résidu sec d'extraction	48 gr. 50.

1. — ÉTUDE DE L'EXTRAIT AQUEUX

L'extrait aqueux obtenu renfermait 1032 γ de nickel, soit 0,0029 %. Une portion aliquote, contenant 103 γ 2 de métal, a été soumise à la dialyse sur sacs de collodion ; dans chaque liqueur de dialyse, on a dosé le nickel total et le nickel minéral (défini comme la fraction soluble dans l'ammoniaque et précipitable par la chaux) ; ce dernier n'a été décelé que dans un seul cas :

1^{re} dialyse :

Nickel total	82 γ 5
Nickel minéral	3 γ

Dans aucune des autres liqueurs de dialyse il n'a été possible de déceler le nickel minéral. Le tableau suivant résume l'ensemble des résultats de ces dialyses.

	Matière sèche dialysée	Nickel total dialysé	Nickel % de la mat. sèche dialysée
1 ^{re} dialyse.....	2 gr. 577	82 γ 5	0,0032
2 ^e »	0 gr. 3182	11 γ 5	0,0036
3 ^e »	0 gr. 1977	5 γ	0,0025
4 ^e »	0 gr. 0791	3 γ	0,0038
Indialysable { Matière sèche.. 0 gr. 4378			
{ Nickel 3 γ 8, soit 0,00086 % de la matière sèche.			

Au total, on a retrouvé dans les diverses fractions 105 γ 8 de nickel (au lieu des 103,2 théoriques), sur lesquels 102 γ se trouvaient dans les fractions dialysables.

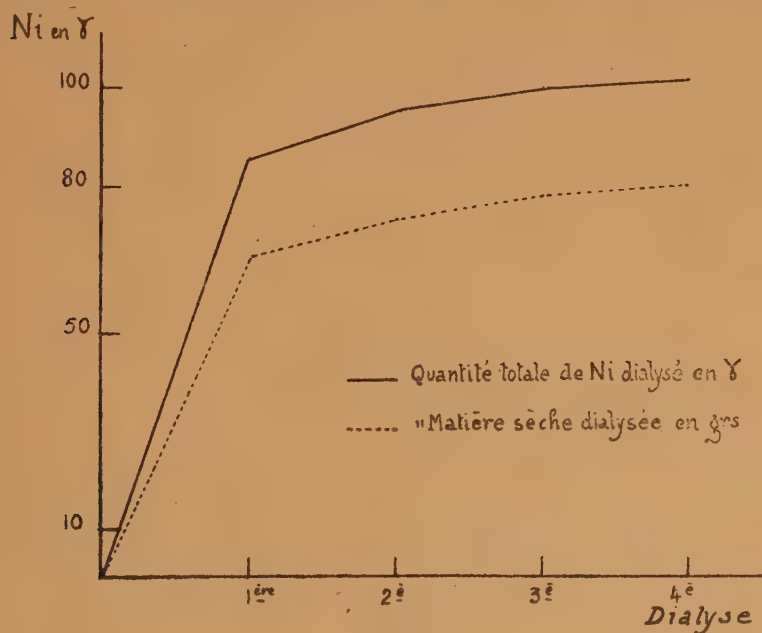


Fig. 7

La presque totalité du nickel contenu dans l'extrait aqueux est donc dialysable. On peut remarquer, en outre, que le pourcentage du nickel par rapport à la matière sèche totale

dialysée reste sensiblement constant et il semble qu'on puisse de ce fait écarter l'hypothèse du nickel minéral. On a vu, d'ailleurs, que le dosage de cette fraction n'en avait révélé la présence qu'en proportion infime. L'allure de la courbe de dialyse de Ni est identique à celle obtenue lors de la précédente étude de l'extrait aqueux et est parallèle à celle de la substance dialysée.

Le nickel contenu dans l'extrait aqueux est donc lié à des substances organiques facilement dialysables et dont la presque totalité diffuse lors de la première dialyse.

Il est difficile de donner des précisions sur la nature même de ces substances ; tout au plus peut-on dire — vu l'intensité de la réaction du biuret dans les liquides de dialyse — qu'elles doivent être, en grande partie, constituées par des produits d'hydrolyse de substances protidiques (albumoses, peptones, etc.), sans qu'on puisse préciser si ces produits préexistaient dans les tissus de *Cardium edule*, ou ont été formés, par hydrolyse, lors de l'extraction aqueuse.

PURIFICATION DE L'EXTRAIT AQUEUX. — L'extrait aqueux renferme une certaine proportion de glycogène, qu'il est possible d'éliminer par addition d'un excès d'alcool.

100 cc. d'extrait, renfermant 413 γ de nickel, ont été traités par 200 cc. d'alcool absolu. Après repos de 24 heures, le précipité abondant fut centrifugé, redissous dans un peu d'eau chaude et reprécipité par l'alcool.

On a ainsi obtenu :

1^o Glycogène : 2 gr. 59 ayant entraîné 26 γ de nickel.

2^o Une solution hydroalcoolique, renfermant 9 gr. 485 de matière sèche et 387 γ de nickel.

Après concentration dans le vide et ajustage à un volume déterminé, la dialyse de la liqueur, opérée sur une portion aliquote, a donné les résultats suivants :

Matière sèche totale : 4 gr. 742		Nickel total 193 γ
	Matière sèche dialysée	Nickel dialysé
1 ^{re} dialyse de 24 h.	2 gr. 012	98 γ
2 ^e dialyse de 24 h.	1 gr. 618	67 γ
3 ^e dialyse de 24 h.	0 gr. 312	27 γ

Au total, 192 γ de nickel — soit la quantité théoriquement en expérience — ont été retrouvés dans les liqueurs dialysées, après 3 dialyses de 24 heures. La matière organique dialysée présente une réaction de biuret intense et ne précipite pas par le sulfate d'ammonium à saturation ; elle renferme vraisemblablement une forte proportion de peptoses.

ESSAIS SUR LA LIQUEUR DE DIALYSE. — Il est possible de précipiter, par addition à cette liqueur d'un grand excès d'alcool, une substance organique renfermant du nickel, ainsi que le montrent les trois essais suivants :

1^{er} essai :

5 cc. de liqueur sont additionnés de 50 cc. d'alcool. Il se forme un précipité floconneux blanc jaunâtre qui est recueilli par centrifugation et séché.

Poids sec 0 gr. 0428
Nickel 4 γ 4 soit 0,0103 %

2^e essai :

Sur 1 cc. de liqueur.

Poids sec 0 gr. 0084
Nickel 1 γ 4 soit 0,013 %

3^e essai :

Sur 15 cc. de liqueur de dialyse (soit 46 γ 8 de nickel). Par addition de dix volumes d'alcool, on détermine la formation

d'un précipité blanc, qui est recueilli par centrifugation, redissous dans un peu d'eau, reprécipité par l'alcool et, finalement, centrifugé après 24 heures de repos.

On obtient ainsi 0 gr. 060 de précipité sec, renfermant $8 \gamma 4$ de nickel, soit 0,014 %.

Le précipité est très soluble dans l'eau ; la solution ne réduit pas la liqueur de Fehling, même après hydrolyse, donne une réaction de biuret intense et est précipitable par l'acétone.

Les eaux-mères hydroalcooliques renferment 1 gr. 135 de matière sèche contenant $31 \gamma 5$ de nickel (soit 0,0028 %) ; elles réduisent fortement la liqueur cupro-potassique et donnent une réaction de biuret positive.

On a donc fractionné de la manière suivante, le nickel contenu dans la liqueur de dialyse.

Nickel précipité par l'alcool avec les protéoses....	8 γ 4
Nickel resté en solution.....	31 γ 5

Au total, 40 γ de nickel ont été retrouvés sur les 46 γ 8 présents.

ESSAI DE FRACTIONNEMENT DE LA LIQUEUR DE DIALYSE.

— La liqueur dialysée fut concentrée dans le vide jusqu'à obtention d'un liquide sirupeux dont 1 cc. renfermait 1 gr. 23 de matière sèche et 9 γ de nickel.

25 cc. d'un tel liquide (renfermant par conséquent 225 γ de nickel) furent additionnés de 10 volumes d'alcool, qui déterminent l'apparition immédiate d'un abondant précipité blanc jaunâtre ; après repos de 24 heures, le précipité est centrifugé, redissous dans un peu d'eau (solution brune, opalescente) et précipité de nouveau par l'alcool.

Le précipité purifié ainsi obtenu, redissous dans un peu d'eau est à nouveau précipité par un excès d'acétone ; on obtient de la sorte un précipité blanc jaunâtre qui est recueilli par centrifugation et des eaux-mères acétoniques opalescentes.

Le précipité acétonique est redissous dans l'eau et la solution traitée à nouveau par un excès d'acétone ; on abandonne quelques jours à la glacière, puis on recueille le précipité par centrifugation ; les nouvelles eaux-mères acétoniques sont réunies aux premières.

Le poids sec du précipité jaune clair finalement obtenu fut de 0 gr. 7396. Sa dissolution fractionnée dans 25 cc. d'eau permet de séparer :

- 1) une liqueur limpide, colorée en brun (liqueur A) ;
- 2) une poudre blanche, peu soluble (précipité B).

L'analyse des diverses fractions a donné les résultats suivants :

	Matière sèche	Nickel
1 ^{res} eaux-mères hydroalcooliques	3 gr. 258	49 γ 5
2 ^{es} eaux-mères hydroalcooliques	1 gr. 033	35 γ
Eaux-mères acétoniques	0 gr. 5554	23 γ 5
Liqueur A	0 gr. 5934	106 γ
Précipité B	0 gr. 1462	Non décelé

Au total, 214 γ de nickel furent retrouvés sur les 225 γ présents.

La plus forte concentration de nickel, soit 0,018 % fut trouvée dans la liqueur A, c'est-à-dire dans les fractions les plus solubles du précipité acétonique.

Il eût été fort intéressant d'entreprendre l'étude plus approfondie de cette fraction, mais sa composition est fort complexe et la quantité totale obtenue en était insuffisante.

Néanmoins, l'intensité de la réaction du biuret et les caractères généraux de précipitation permettent de conclure qu'on se trouve en présence d'un mélange renfermant de fortes proportions de protéoses ; la liqueur ne précipitant pas sur le sulfate d'ammonium à saturation, on est conduit à admettre que ces protéoses sont surtout constitués de pep-toses, c'est-à-dire de substances protidiques ayant subi une

dégradation assez poussée. Ceci confirme les conclusions déduites de l'étude de la marche de la dialyse ; mais il demeure impossible de savoir si de telles substances préexistaient dans les tissus de *Carlum edule*, ou si elles ont été libérées lors des traitements qu'on leur fit subir.

2. — ÉTUDE DU RÉSIDU D'EXTRACTION AQUEUSE

Le résidu d'extraction aqueuse, séché à 50° jusqu'à poids constant de 48 gr. 50, a été homogénéisé par pulvérisation et tamisage. Le dosage du nickel effectué sur une portion aliquote indique une teneur de 15 γ 2 par gramme de poudre.

Comme précédemment, cette poudre a été soumise à l'action des diastases protéolytiques, mais dans des conditions plus précises.

ACTION DE LA PEPSINE

Il importe de contrôler la valeur réelle de cette action, en soumettant la poudre parallèlement et dans des conditions rigoureusement identiques, à l'attaque par la pepsine en milieu chlorhydrique et à l'action de l'acide chlorhydrique seul.

1^{er} ESSAI. — Deux fioles coniques de capacité identique ont été préparées de la façon suivante :

Fiole I		Fiole II	
Poudre de <i>C. edule</i>	5 gr.	Poudre de <i>C. edule</i>	5 gr.
Eau bidistillée	100 cc.	Eau bidistillée	100 cc.
Acide chlorhydrique.....	0 cc. 2	Acide chlorhydrique....	0 cc. 2
		Pepsine (titre 100)	0 gr. 25

Les deux fioles ont été placées dans un thermostat réglé à 50° et y furent maintenues pendant 6 h. 30. Après centrifugation, le liquide fut analysé.

Fiole I		Fiole II	
Extrait sec total	1 gr. 42	Extrait sec total	1 gr. 81 (après déduction du poids de pepsine introduite)
Nickel total	33 γ	Nickel total	65 γ

L'action de la pepsine a entraîné une solubilisation du nickel double de celle due à la seule action de l'acide chlorhydrique dilué, mais cette dernière demeure importante.

Le résidu insoluble provenant de l'attaque pepsique (fiole II) pesait 3 gr. 442 et renfermait 9 γ 6 de nickel ; la somme du nickel contenu dans la fraction aqueuse et dans cette fraction insoluble représente sensiblement les 75 γ théoriquement présents.

Le résidu de la fiole I, provenant de la seule hydrolyse chlorhydrique a été soumis à son tour à l'action de la pepsine, dans des conditions identiques à celles du premier essai.

Après 6 heures de dialyse, on a solubilisé 0 gr. 908 de matière renfermant 28 γ 9 de nickel.

2^e ESSAI. — Cet essai fut conduit d'une manière analogue au précédent, mais la digestion fut prolongée de manière à permettre l'attaque des combinaisons lipido-protéidiques éventuellement présentes. En outre, l'activité de la pepsine ajoutée fut contrôlée sur une quantité de fibrine normalisée identique à la quantité de poudre de *Cardium edule* en expérience.

Fiole I		Fiole II		Fiole III	
Poudre	2 gr	Poudre	2 gr.	Fibrine	2 gr.
Eau bidist. ...	50 cc.	Eau bidist. .	50 cc.	Eau bidist. .	50 cc.
ClH	0 cc. 1	ClH	0 cc. 1	ClH	0 cc. 1
		Pepsine ...	0 gr. 100	Pepsine ...	0 gr. 100

Les trois fioles furent abandonnées pendant 48 heures dans un thermostat réglé à 50°.

La quantité de pepsine s'est montrée suffisante pour hydro-

lyser totalement la fibrine, selon l'essai décrit par le Codex (absence de réaction par l'acide nitrique).

Les analyses des liqueurs d'hydrolyse chlorhydrique et pepsique ont donné les résultats suivants.

Fiole I		Fiole II	
(Hydrolyse chlorhydrique)		(Hydrolyse pepsique)	
Matière sèche solubilisée .	0 gr. 7263	Matière sèche solubilisée .	0 gr. 8314
Nickel	16 γ 25	Nickel	26 γ 4

La digestion prolongée a favorisé l'hydrolyse chlorhydrique et la différence entre les quantités de nickel obtenues dans les deux cas n'est pas aussi grande que dans le premier essai. Par contre, une fraction du nickel a encore échappé à l'action de la pepsine, et on retrouve effectivement dans le résidu insoluble provenant de la fiole II, 4 γ 8 de nickel.

Le résidu insoluble de la fiole I (hydrolyse chlorhydrique) a été, à son tour, soumis à l'action de la pepsine. Le produit qui pesait, après dessiccation à 100-105°, 1 gr. 1757 fut divisé en deux portions, dont l'une fut soumise à l'action de la pepsine et l'autre, comparativement, à une nouvelle hydrolyse chlorhydrique.

Voici, rapportés à la totalité du produit sec, les résultats de ces deux essais :

Fiole I		Fiole II	
(2-e hydrolyse chlorhydrique du résidu)		(Hydrolyse pepsique du résidu)	
Matière sèche solubilisée .	0 gr. 1368	Matière sèche solubilisée..	0 gr. 5110
Nickel solubilisé	2 γ 6	Nickel solubilisé	13 γ 2

La totalité du nickel contenu dans la poudre constituant le résidu d'extraction aqueuse des tissus de *Cardium edule* est donc hydrolysable par la pepsine, si l'on prolonge suffisamment la digestion ou l'attaque chlorhydrique. On retrouve, en effet, dans les liquides de digestion 29 γ 5 de nickel pour les 30 γ 4 théoriquement contenus dans la prise d'essai ; le dernier résidu, provenant de l'hydrolyse pepsique de la substance ayant résisté à l'hydrolyse chlorhydrique, pesait 0 gr. 388 et ne renfermait plus de nickel.

3^e ESSAI.

Fiole I		Fiole II	
Poudre	1 gr.	Poudre	1 gr.
Eau bidist.....	50 cc.	Eau bidist.....	50 cc.
ClH	1 cc.	ClH	1 cc.
		Pepsine	0 gr. 050

Après 6 h. 30 de digestion à 50°, l'analyse des différentes fractions a donné les résultats suivants :

Matière sèche solubilisée.	0 gr. 3805	Matière sèche solubilisée.	0 gr. 4557
Nickel solubilisé	5 γ 1	Nickel solubilisé	10 γ 3

Cet essai confirme les précédents : pour une digestion de 6 h. 30, la quantité de nickel dissous grâce à la pepsine est environ double de celle due à la seule action de l'acide chlorhydrique.

ÉTUDE DE LA DIGESTION PEPSIQUE EN FONCTION DU TEMPS

Pour compléter les essais précédents, il semblait nécessaire de voir comment se comporte la pepsine au point de vue de la digestion des substances organiques contenant du nickel, en fonction du temps, comparativement à la seule hydrolyse chlorhydrique.

Les deux essais ont été conduits simultanément sur 5 grammes de poudre.

Fiole I		Fiole II	
Poudre	5 gr.	Poudre	5 gr.
Solution de ClH		Solution de pepsine	
à 2 ‰	50 cc.	à 0,5 ‰ dans ClH à 2 ‰	50 cc.

La solution chlorhydrique et la solution de pepsine dans ClH dilué (et dont 50 cc. représentaient 0 gr. 25 de pepsine) étaient maintenues à la température de 50° ; les fioles I et II étaient abandonnées dans le thermostat à 50° pendant un

certain temps, après lequel on centrifugeait rapidement leur contenu : les solutions étaient analysées et les parties insolubles remises en suspension dans les solutions correspondantes, étaient de nouveau placées dans le thermostat.

Les résultats des analyses de la matière sèche solubilisée furent les suivantes :

Fiole I		Fiole II	
1 ^{er} prélèvement			
Matière sèche	1 gr. 3076	Matière sèche	1 gr. 2431
Nickel	26 γ 3	Nickel	54 γ 5
2 ^e prélèvement			
Matière sèche	0 gr. 2948	Matière sèche	0 gr. 5005
Nickel	5 γ 7	Nickel	9 γ 2
3 ^e prélèvement			
Matière sèche	0 gr. 1335	Matière sèche	0 gr 3780
Nickel	2 γ 2	Nickel	4 γ 8
4 ^e prélèvement			
Matière sèche	0 gr. 1271	Matière sèche	0 gr. 4000
Nickel	1 γ 8	Nickel	3 γ 6
5 ^e prélèvement			
Matière sèche	0 gr. 2771	Matière sèche	0 gr. 5483
Nickel	traces	Nickel	1 γ 2

Au total, 73 γ 3 ont été solubilisés sous l'action de la pepsine contre 46 γ sous l'action de l'acide chlorhydrique seul.

Le résidu, après la 5^e digestion pepsique pesait 2 gr. 138 et renfermait une petite quantité de nickel ayant résisté à l'attaque : l'analyse de ce résidu a révélé la présence de 4 γ 9 de nickel.

Quant au produit ayant résisté à la 5^e hydrolyse chlorhydrique, il fut soumis à l'action de la pepsine et, après six heures de digestion, à la température de 50°, la quantité de matière solubilisée fut de 0 gr. 6247 ; le liquide renfermait 23 γ 8 de nickel, soit approximativement la totalité du nickel attaquant par la pepsine subsistant dans le résidu de l'hydrolyse chlorhydrique.

Le graphique ci-dessous résume les résultats obtenus.

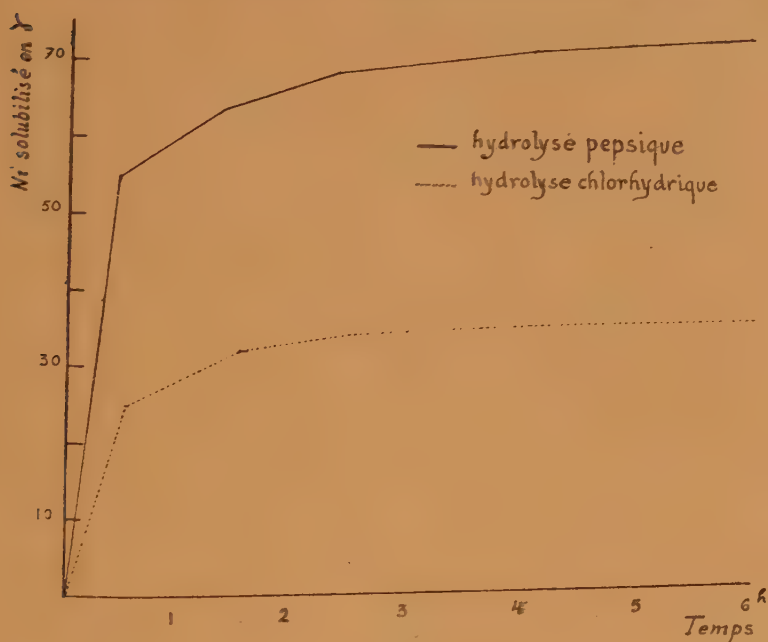


Fig. 8

On constate que la presque totalité du nickel attaquable, tant par la pepsine que par l'acide chlorhydrique, est solubilisée très rapidement, au cours de la première heure de digestion.

ÉTUDE DE LA DIGESTION PAPAÏNIQUE EN FONCTION DU TEMPS

Cette étude fut conduite de manière identique à la précédente, mais en opérant à pH voisin de la neutralité et à la température de 70° pour les premières digestions ; vers la fin de l'expérience, la température du thermostat fut élevée

à 90°. La digestion de la poudre par l'eau bidistillée fut examinée parallèlement.

Le graphique ci-dessous reproduit les résultats de cette expérience.

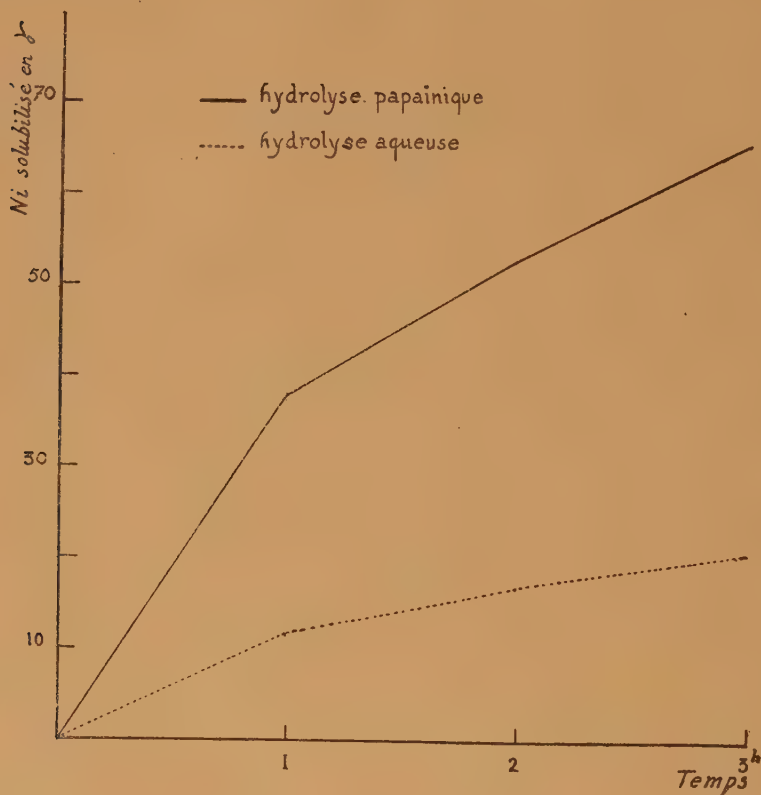


Fig. 9

Après la dernière digestion papainique, il reste un résidu non attaqué, pesant 1 gr. 914 et renfermant 9 γ 8 de nickel. La plus grande partie du nickel contenue dans la poudre (soit 65 γ) est donc hydrolysable par la papaïne.

La quantité de métal solubilisé par digestion aqueuse a été relativement faible et ceci est normal, le produit ayant déjà

subi deux extractions à l'eau bouillante. Le résidu de digestion aqueuse, pesant 4 gr. 567 renfermait 54 γ 9 de nickel.

CONCLUSION

De l'ensemble des essais précédents on peut conclure que le nickel contenu dans le résidu d'extraction aqueuse est combiné à des molécules protidiques ; l'allure des graphiques de digestions pepsique et papaïnique en fonction du temps ne saurait laisser de doutes à ce sujet. Ces substances protidiques ont vraisemblablement été insolubilisées par le traitement des tissus à l'eau bouillante. Il semble que la combinaison protidique du nickel soit assez faiblement hydrolysable : l'acide chlorhydrique dilué libère des proportions importantes de métal, mais peut-être ce fait est-il dû aux modifications que le traitement par l'eau bouillante a fait subir aux constituants des tissus de *Cardium edule*.

Le liquide provenant de l'hydrolyse pepsique, soumis à la dialyse dans des sacs de collodion contre l'eau distillée, laisse dialyser tout le nickel qu'il contient. L'essai fut fait à partir d'un liquide renfermant au total 15 γ de nickel et a donné les résultats suivants :

	Matière sèche dialysée	Nickel dans la matière sèche
1 ^{re} dialyse (24 h.).....	0 gr. 4716	10 γ 3
2 ^e » (48 h.).....	0 gr. 1541	3 γ 8
3 ^e » (48 h.).....	0 gr. 0770	1 γ 3

La fraction indialysable pesait 0 gr. 0725 et ne renfermait plus de nickel.

Le nickel est lié à des substances très facilement dialysables puisque la plus grande partie du métal se retrouve dans l'eau bidistillée après 24 heures de dialyse. On sait que les protéoses sont assez facilement dialysables, et ceci confirme l'hypothèse formulée plus haut.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

I. — Ce travail débute par une étude historique des travaux concernant la présence et le rôle possible du nickel et du cobalt chez les êtres vivants, ainsi qu'une revue d'un certain nombre de recherches relatives au cuivre et au zinc. Il expose ensuite comment j'ai cherché à établir des techniques colorimétriques sensibles et précises, permettant de doser ces éléments dans la matière vivante, à partir de prises d'essai aussi réduites que possible.

a) Pour le nickel, j'ai montré qu'il était possible, grâce à l'emploi de l'électro-photomètre, d'évaluer, avec une bonne approximation, des quantités de l'ordre du millième de milligramme, en mettant à profit la réaction colorée intense que donnent ses sels tétravalents avec la diméthylglyoxime.

b) Le dosage du cobalt présente plus de difficultés ; l'emploi de l' α -nitroso- β -naphtol conduit à des résultats satisfaisants, à condition de suivre rigoureusement le mode opératoire mis au point ; on peut alors déceler jusqu'à 0,05 du métal.

c) Pour le dosage du cuivre, deux réactions classiques ont été adaptées au dosage colorimétrique à l'électro-photomètre : la réaction « de l'eau céleste », lorsque les prises d'essai sont assez riches en cuivre ; la réaction du ferrocyanure de cuivre, pour les teneurs de quelques centièmes de milligrammes de métal. Pour cette dernière réaction, il convient d'observer quelques précautions, en raison du caractère colloïdal du composé dont il faut éviter la floculation.

d) Une microméthode colorimétrique de dosage du fer est enfin décrite, permettant de doser rapidement de 2 à 50 γ

de métal et basée sur la mesure de l'intensité de la solution chloroformique du complexe fer-cupferron. Il a été nécessaire de procéder au préalable à une étude détaillée des différentes phases de la réaction en vue de fixer un mode opératoire permettant la stabilisation du complexe pendant un temps suffisant pour effectuer avec sécurité les mesures colorimétriques. Il convient d'insister, en outre, sur le fait que les phosphates n'exercent aucune influence nuisible sur le dosage.

II. — Ces techniques étant établies à partir de solutions pures, j'ai cherché quelle était la meilleure méthode à suivre pour isoler ces métaux du mélange complexe constitué par le résidu minéralisé de la matière vivante.

La technique au zincate de calcium donne à ce point de vue toute satisfaction ; il est remarquable de constater que des quantités extrêmement faibles de métal (1 γ de Ni ou de Co dans 100 cc. d'eau, par exemple) sont intégralement précipitées par ébullition de la liqueur en excès d'hydroxyde de calcium. La précipitation préalable du fer et du manganèse par un excès d'ammoniaque concentrée n'entraîne pas de quantités appréciables de cuivre, zinc, nickel ou cobalt, si l'on observe, pour le lavage, la technique indiquée.

Parmi les procédés de destruction de la matière vivante, la méthode sulfo-nitro-perchlorique a été choisie en raison de sa commodité ; un certain nombre d'essais m'ont permis de vérifier qu'elle ne s'accompagne pas de pertes sensibles des métaux dosés.

Il est très important d'attirer l'attention sur le fait que les réactifs doivent être l'objet de purifications spéciales très poussées de contrôles fréquents ; si cette précaution était négligée, les analyses n'auraient aucune signification, étant donnée la quantité extrêmement faible de métal décelé.

III. — Des dosages effectués sur quelques espèces de

mollusques lamelibranches ont permis de mettre en évidence la présence générale de nickel et de cobalt. La teneur moyenne est de 0 mg. 2 à 0 mg. 5 pour 1.000 grammes de matière fraîche, dans le cas du nickel ; pour le cobalt, la teneur moyenne est un peu moindre.

Quelques espèces font exception : *Scrobicularia piperata* Gmel. et surtout *Cardium edule* Lin. dans lequel j'ai trouvé une teneur en nickel tout à fait remarquable.

Il n'a pas été possible de trouver de relations entre les teneurs de ces métaux et celles de cuivre et de zinc dans les mêmes échantillons. Par contre, le fer suit étroitement les variations du nickel et du cobalt.

L'examen de la localisation des métaux dans les organes a permis de préciser les conclusions de cette première étude. Le nickel et le cobalt s'accumulent surtout dans l'hétopancréas ; les branchies sont riches et, par contre, les organes génitaux remarquablement pauvres. Dans les organes également, le fer accompagne le nickel et le cobalt, chez la plupart des échantillons analysés. Les résultats obtenus pour le cuivre et le zinc confirment la plupart des travaux antérieurs ; on retrouve l'accumulation déjà signalée pour ces deux métaux chez *Ostrea edulis* Lin. et *Gryphea angulata* Lam.

De l'examen d'un certain nombre d'échantillons soigneusement déterminés d'huîtres vertes et blanches de même origine, il ressort que, pour tous les échantillons d'*Ostrea* analysés, les huîtres vertes étaient plus riches en fer que les huîtres blanches ; un fait analogue n'a pas pu être mis en évidence pour les Gryphées.

IV. — Des extractions aqueuses et alcooliques de tissus de *Cardium edule*, suivies de plusieurs fractionnements, m'ont permis de montrer que le nickel présent dans ces tissus se trouve lié, en grande partie, à plusieurs groupes de substances protidiques. Une fraction importante est combinée à des protides coagulables par la chaleur et hydrolysables

par la pepsine et la papaïne; la majeure partie de la quantité restante est liée à des substances solubles dans l'eau bouillante et dialysables, qui paraissent constituées (réaction de biuret et caractères généraux de précipitation) par des produits de dégradation plus ou moins avancée des substances protidiques.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- (1) ALTEN (F.), WIELAND (H.) et HILLE (E.). — *Z. anorg. allgem. Chem.*, **215**, 81, 1933.
- (2) ASKEW (H.-O.). — *New Zealand J. Sci. Tech.*, **18**, 707, 1937.
- (3) ASKEW (H.-O.) et DIXON (J.-K.). — *Ibid.*, **18**, 73, 1936.
- (4) ATACK. — *Analyst*, **38**, 316, 1913.
- (5) BALLAND. — *J. Pharm. Chimie*, **27**, 469, 1878.
- (6) BAUDISCH. — *Chem. Zeits.* **33**, 1238, 1909.
- (7) BELL (M.-E.). — *New Zealand J. Sci. Tech.*, **18**, 1937, 716.
- (8) BERG (R.). — *Biochem. Z.*, **165**, 1925, 461.
- (9) BERTRAND (Gabriel). — *Comptes rendus*, **115**, 939, 1892.
- (10) BERTRAND (Gab.). — *Bull. Soc. chim.*, **35**, 41, 1924.
- (11) BERTRAND (Gab.) et BENZON (B.). — *Comptes rendus*, **175**, 289, 1922.
- (12) BERTRAND (Gab.) et BHATTACHERJEE. — *Ibid.*, **198**, 1823, 1934.
- (13) BERTRAND (Gab.) et JAVILLIER (M.). — *Bull. Soc. chim.*, **1**, 63, 1907.
- (13 bis) — *Ibid.*, **3**, 114, 1908.
- (14) BERTRAND (Gab.) et MACHEBŒUF (M.). — *Comptes rendus*, **180**, 1380, 1925.
- (15) — *Ibid.*, **180**, 993, 1925.
- (16) — *Ibid.*, **182**, 1305, 1926.
- (17) — *Ibid.*, **183**, 5, 1926.
- (18) — *Ibid.*, **183**, 257, 1926.
- (19) BERTRAND (Gab.) et MOKRAGNATZ. — *Comptes rendus*, **175**, 112, 1922.
- (19 bis) — *Ibid.*, **175**, 458, 1922.
- (20) — *Ibid.*, **179**, 1566, 1924.
- (22) — *Bull. Soc. chim.*, **37**, 326, 1925.
- (23) — *Bull. Soc. chim.*, **33**, 1539, 1923.
- (24) BERTRAND (G.) et NAKAMURA. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **16**, 1366, 1934.
- (25) BERTRAND (G.) et THOMAS. — *Guide pour les manipulations de Chimie biologique*. Dunod, édit. Paris, 1919.
- (26) BERTRAND (G.) et VLADESCO. — *Comptes rendus*, **171**, 1016, 1920.

- (27) BERTRAND (G.) et VLADESCO. — *Bull. Soc. chim.*, **31**, 268, 1922.
(28) — *Ibid.*, **33**, 341, 1923.
(29) — *Comptes rendus*, **172**, 698, 1921.
(30) — *Bull. Soc. chim.*, **31**, 790, 1922.
(30 bis) BERTRAND (G.) et WEBER. — *Comptes rendus*, **202**, 1629, 1936.
(31) BIAZZO. — *Ann. chim. applicata*, **16**, 96, 1926.
(32) BINET (L.) et STRUMA (M.-V.). — *Paris-Médical*, **23**, 28, 1933 et
Bull. Soc. sci. hyg. alim., **23**, 53, 1933.
(33) BISHOP (E.-R.) et LAWRENCE (M.). — *Science*, **75**, 264, 1932.
(34) BIZIO. — *Ann. dell. Scienze del Regno Lomb. Venet.*, **34**, 1883.
(35) BODANSKY. — *Comptes rendus*, **173**, 790, 1921.
(36) — *Journ. biol. chem.*, **44**, 399, 1920.
(37) BODE (G.). — *Wochenschr. Brauerei*, **50**, 321, 1933.
(38) BRADLEY. — *Science*, **19**, 1906, 1904.
(39) BRANDT-BEAUZEMONT (Y.). — *Thèse doc. Univ. Paris*, 1931.
(40) BRAUN et BELLINGRODT. — *Poggendorffs Annalen*, **92**, 175, 1854.
(41) BRISKAS (S.-B.). — *Rev. path. comp. hyg. gén.*, **34**, 1783, 1934.
(41 bis) — *Bull. Soc. sci. hyg. alim.*, **24**, 79, 1934.
(42) CHAROTTINE. — *Ind. Chimica*, **8**, 32, 1933.
(43) CORNEC. — *Comptes rendus*, **168**, 513, 1919.
(44) COULSON (J.). — *Investigational rept.*, **17**, 30, 1933.
(45) COULSON (J.), LEVINE (H.) et REMINGTON (R.-E.). — *Ann. J. Pub. Health*, **22**, 1141, 1932.
(46) CUNNINGHAM (J.). — *Biochem. Journ.*, **25**, 1257, 1931.
(47) CUZENT. — *J. de Chimie méd.*, 295, 1863.
(48) DELEZENNE. — *Ann. Institut Pasteur*, **33**, 68, 1919.
(49) DENIGES (L.). — *Comptes rendus*, **194**, 895, 1932.
(50) DEY (M.-A.). — *Thèse doctorat Sciences*, Paris, 1937.
(51) DHERE (Ch.). — *J. physiol. path. gén.*, **18**, 222, 1919.
(52) DIXON (J.-K.). — *New Zealand J. Sci. Tech.*, **18**, 710, 1937.
(53) DUBOIS (R.). — *Comptes rendus Soc. Biol.*, **52**, 392, 1900.
(54) DUTOIT et ZBINDEN. — *Comptes rendus*, **190**, 172, 1930.
(55) EISLER, ROSDALL et THEORELL. — *Biochem. Z.*, **285**, 76, 1936.
(56) ELVEHJEM (C.-A.) et SHERMANN (W.-C.). — *J. biol. Chem.*, **98**, 309, 1932.
(57) ELVEHJEM (C.-A.). — *Physiol. Rev.*, **15**, 471, 1935.
(58) — *J. biol. Chem.*, **97**, XVI, 1932.
(59) FEIGL (F.). — *Ber*, **57**, 758, 1924.
(60) — *Qualitative Analyse mit Hilfe von Tütpl-Reaktionen*.
(61) — *Ber.*, **56**, 2083, 1923.
(62) FEIGL (F.) et TUSTANOWSKA (L.-V.). — *Ber.*, **57**, 762, 1924.

- (63) FERRAND. — *Ostréonomie. « Huîtres toxiques et huîtres comestibles diverses »*, Lyon, 1863.
- (64) FISCHER et SCOTT. — *Biochem. J.*, **29**, 1055, 1935.
- (65) FISCHER (E.). — *Liebigs' Ann.*, **211**, 248, 1881.
- (66) FOX et RAMAGE. — *Nature*, **126**, 682, 1930.
- (67) GHITESCU (V.). — *Thèse doctorat Sciences*, Paris, 1934.
- (68) GOLSE. — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, p. 209, 1930 et p. 126, 1933.
- (69) — *Ibid.*, p. 262, 1933.
- (70) GIAYA. — *Comptes rendus*, **170**, 906, 1920.
- (71) DE GOYLER (E.). — *Econ. géol.*, **19**, 550, 1924.
- (72) GRUZEWSKA (Z.) et ROUSSEL (G.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **20**, 365, 1938.
- (73) GUERITHAUT (B.). — *Bull. Sci. pharm.*, **18**, 633, 1911.
- (74) GUILLEMET. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **14**, 1350, 1932.
- (75) HERDMANN (W.-A.) et BOYCE (R.). — *Rept. Thompson. Yates, Labor.*, Liverpool, 11, 1898, 1899.
- (76) HILTNER (R.-S.) et WICHMANN. — *J. biol. Chem.*, **38**, 205, 1919.
- (77) HUBBEL et MENDEL. — *J. biol. Chem.*, **75**, 567, 1927.
- (78) JAILLARD. — *Ann. d'Hyg.*, p. 276, 1881.
- (79) JAVILLIER (M.). — *Thèse doct. Sciences*, Paris, 1908.
— *Comptes rendus* **145**, 1242, 1907; **146**, 365, 1908; **155**, 190, 1551, 1912; **156**, 406, 1913.
- (79 bis) — *Ibid.*, **158**, 140, 1914.
- (79 ter) — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **1**, 55, 1914
- (80) JOHN. — *Die Ernährung der Pflanzen 1816 in Holland gekronte Preisschrift*. Berlin, 1819, p. 250-75.
- (81) JONES (E. G.). — *Chem. News*, 117, 336, 1918.
- (82) JONES (M. B.). — *Analyst*, **54**, 582, 1929.
- (83) KAHANE (E.). — « L'action de l'acide perchlorique sur la matière organique », *Act. Sc. et Ind.*, édit. Hermann, 1934, n° 167 et 168.
- (84) KAUFFMANN (H. P.) et KELLER (M.). — *Chem. Umschau. Fette. Oele. Wachse. Harze*. **37**, 142, 1930.
- (85) KEIL (H. K.) et NELSON (V. E.). — *J. biol. Chem.*, **93**, 49, 1931.
- (86) KIDSON, ASKEW et DIXON. — *New Zealand J. Sci. Tech.*, **18**, 601, 1936.
- (87) KNORE et ILINSKY. — *Ber.*, **18**, 699, 1855.
- (88) KORENMANN. — *J. Prikl. Khim.*, **7**, 1092, 1934.
- (89) KUHLEBERG (L. M.). — *J. Chim. Ukraine*, **8**, 32, 1933.
- (90) LAVOLLAY (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **17**, 432, 1935.
- (91) LECHERTIER et BELLAMY. — *Comptes rendus*, **84**, 687, 1877.

- (92) LEHMANN (K. B.). — *Arch. f. Hyg.*, **24**, 1-83, 1892.
- (93) LOWE (W. F.). — *The Analyst*, 1897.
- (94) LUGG (J. W.) et JOSLAND (S. W.). — *Austral. J. exptl. Biol. Med. Sci.*, **14**, 319, 1936.
- (95) MCCOLLUM et NEWELL. — *J. Nutrition*, **6**, 289, 1933.
- (96) MCHARGUE (J. S.). — *Journ. Agr. Research.*, **30**, 193, 1925.
- (97) MCHARGUE (J. S.). — *Ann. J. Physiol.*, **77**, 245, 1926.
- (98) — *Ind. Eng. Chem.*, **19**, 274, 1927.
- (99) MACPHERSON (T.) et STEWART (J.). — *Biochem. J.*, **32**, 763, 1938.
- (100) MAQUENNE. — *Bull. Soc. chim.*, **29**, 581, 1921.
- (101) MAQUENNE et DEMOUSSY. — *Comptes rendus*, **170**, 87, 1920.
- (101 bis). — *Bull. Soc. chim.*, **29**, 585, 1921.
- (102) MARTIN. — *Mikrochemie*, **8**, 41, 1930.
- (103) MAYA (C.). — *Z. anal. Chem.*, **98**, 402, 1934.
- (104) MAYA (C.) et FEIGL (F.). — *Z. anal. Chem.*, **90**, 15, 1932.
- (105) MAZE. — *Ann. Inst. Pasteur*, **72**, 720, 1908.
- (106) MEISSNER (W.). — *Schweigger's Jahrbuch der Chemie u. Physik.*, **17**, 340 et 436, 1816.
- (107) MENDEL et BRADLEY. — *Am. J. Physiol.*, **14**, 313, 1905.
- (108) MEUNIER (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **17**, 548, 1935.
- (109) — *Ibid.*, **19**, 113, 1936.
- (109 bis). — *Thèse doctorat Sciences*, Paris, 1936.
- (110) MOKRAGNATZ. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, **13**, 61, 1931.
- (110 bis) — *Thèse doct. Sciences*, Paris, 1922.
- (111) MOKRANTZ (M. S.). — *Bull. Soc. chim. Roy. Yougosl.*, **3**, 221, 1932.
- (112) MYERS (V. C.) et BEARD (H. H.). — *J. biol. Chem.*, **94**, 71, 1931.
- (113) NEAL (M.) et AHMANN (C. F.). — *Science*, **86**, 225, 1937.
- (114) NELSON (J.). — *Ann. Rept.*, **36**, 246, 1915.
- (115) NEWELL (J. M.) et MCCOLLUM (E. V.). — *Investigational Rept.*, **5**, 1, 1931.
- (116) NUKA (P.). — *Z. anal. Chem.*, **91**, 29, 1932.
- (117) OCHOTEN et STUSCHOFF. — *Z. analyt. Chem.*, **90**, 109, 1932.
- (118) PAULAIS (R.). — *Comptes rendus*, **203**, 685, 1936.
- (119) — *Ibid.*, **204**, 1508, 1937.
- (120) — *Ibid.*, **206**, 783, 1938.
- (121) PHILIPPOT. — *Bull. Soc. chim. Belge*, **44**, 140, 1935.
- (122) PHILIPPS. — *Paper from the Dept. of Marine biology of the Carnegie Institution of Washington. Publication 251*, 1917.
- (123) PINKUS et MARTIN. — *J. de Chim. Phys.*, **24**, 83 et 137, 1927.
- (124) PRYTCHERCH (H.). — *Science*, **73**, 429, 1931.
- (125) RATHERY (F.) et Mlle LEVINA (L.). — *Comptes rendus*, **183**, 326, 1926.

- (126) RAULIN. — *Thèse doct. Sci. phys.*, Paris, 1870.
- (127) ROLLET (A.). — *Comptes rendus*, **183**, 212, 1926.
- (128) ROSE et BODANSKY. — *J. biol. Chem.*, **44**, 99, 1920.
- (129) SALE. — *Zinc et Manganèse dans les huîtres de Chesapeake Bay.*, 1915,
- (130) SARZEAU. — *Journ. Pharm. Chim.*, **15**, 1830 et **18**, 217, 332, 635, 1832.
- (131) SCHECKENTHAL (G.). — *Z. Pflanzenernähr., Düng. Bodenk.*, **10A**, 104, 1927.
- (132) SEVERY (H. W.). — *J. biol. Chem.*, **55**, 79, 1923.
- (133) SHERMANN (W. C.), ELVEHKEM (C. A.) et HART (E. B.). — *J. biol. Chem.*, **107**, 383, 1934.
- (134) SOULE. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **47**, 981, 1925.
- (135) SPACU. — *Bull. Soc. Stinte, Cluj*, **1**, 284, 1922.
- (136) STARE (F. S.) et ELVEHJEM (C. A.). — *J. biol. Chem.*, **99**, 473, 1933.
- (137) STIRN, ELVEHJEM et HART. — *Am. J. Physiol.*, **107**, 146, 1926.
- (138) SZEGOE (L.) et CASSONI (B.). — *Giorn. chim. ind. applicata*, **15**, 281, 1933.
- (139) TASSILLY. — « La spectrophotométrie en analyse », *Ann. Fals*, février 1913.
- (140) TSCHUGAEFF (L. A.). — *J. Soc. Phys. Chim. Russe*, **41**, 184, 1909.
- (141) — *Ibid.*, **41**, 214, 1909.
- (142) UNDERHILL (F. A.), ORTEN (J. M.) et LEWIS (R. C.). — *J. biol. Chem.*, **91**, 13, 1931.
- (143) VERNADSKY (W. I.). — *Comptes rendus*, **175**, 382, 1922.
- (144) VLADESCO. — *Thèse doct. Sciences*, Paris, 1921.
- (145) WANG-TAI-SI. — *Thèse doct. Sciences*, Paris, 1928.
- (146) WEBB (D. A.). — *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **21**, 487, 1937.
- (147) WHITE (Cl. P.). — *The Lancet*, p. 701, 1921.
- (148) WILLARD. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **30**, 902, 1908.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE ET TECHNIQUES ANALYTIQUES

Chapitre I. — Historique	7
Chapitre II. — Établissement des techniques de dosage du nickel, du cuivre, du cobalt et du fer.....	27
Chapitre III. — Isolement des métaux à partir d'un mélange complexe	62
Chapitre IV. — Destruction de la matière organique.....	71
Chapitre V. — Les réactifs et leur purification. — Le matériel	94

DEUXIÈME PARTIE

RÉSULTATS ANALYTIQUES

Chapitre I. — Le cuivre, le zinc, le nickel et le cobalt dans quelques espèces de mollusques lamellibranches.	101
Chapitre II. — Le cuivre, le zinc, le nickel et le cobalt dans les principaux organes des mollusques lamelli- branches	115
Chapitre III. — La teneur des huitres en fer, cuivre et zinc, et le phénomène du verdissement.....	128

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DU NICKEL DANS LES TISSUS DE *CARDIUM EDULE*

Chapitre I. — Le nickel dans le sang de <i>Cardium edule</i>	143
Chapitre II. — Étude des extraits aqueux et alcooliques des tissus de <i>Cardium edule</i>	147
Chapitre III.....	160
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	175
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	179

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LE VERDISSEMENT DES HUITRES

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 20 Mars 1939.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

G. ROUSSY.

Imprimé par R. BUSSIÈRE
à Saint-Amand (Cher), France. — 5-4-1939.

